

**Identifikation einer neuen WRKY-Transkriptionsfaktor-
bindungsstelle in bioinformatisch identifizierten,
Pathogen-responsiven *cis*-Elementen aus *Arabidopsis thaliana***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Fabian Machens
aus Hildesheim

1. Referent:	apl. Prof. Dr. Reinhard Hehl
2. Referent:	Prof. Dr. Ludger Beerhues
eingereicht am:	03.04.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	30.05.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Niemeyer, J., Machens, F., Fornefeld, E., Keller-Hüschemenger, J., Hehl, R. (2011). Factors required for the high CO₂ specificity of the anaerobically induced maize *GapC4* promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell. Environ.* **34** (2): 220–229.

Koschmann, J., Machens, F., Becker, M., Niemeyer, J., Schulze, J., Bülow, L., Stahl, D.J., Hehl, R. (2012). Integration of bioinformatics and synthetic promoters leads to the discovery of novel elicitor-responsive *cis*-regulatory sequences in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **160** (1): 178–191.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
2.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII
3.	Einleitung	1
3.1.	Pflanzen sind einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt	1
3.2.	Das pflanzliche Immunsystem.....	1
3.3.	Transkriptionelle Netzwerke in der Pathogenantwort.....	6
3.4.	Bioinformatische und experimentelle Analysen können zur Identifizierung neuer <i>cis</i> -Elemente führen	8
3.5.	Ein neues <i>cis</i> -Element in Motivgruppe 27?	11
3.6.	Ziele dieser Arbeit	12
4.	Material und Methoden.....	14
4.1.	Chemikalien & Enzyme.....	14
4.2.	Lösungen	14
4.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	15
4.2.2	Antibiotika- und Herbizid-Lösungen	15
4.2.3	Isolation und Transfektion von Petersilie-Protoplasten.....	16
4.2.4	Isolation und Transfektion von <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten.....	17
4.2.5	Sterilisation und Aussaat von <i>Arabidopsis</i> -Samen	18
4.2.6	Transformation von <i>A. thaliana</i>	19
4.2.7	Transformation von Hefe-Zellen.....	19
4.2.8	Plasmidpräparation aus Hefe-Zellen	20
4.2.9	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	20
4.2.10	Proteinbestimmung nach Bradford.....	22
4.2.11	Aufreinigung His-getaggtter Proteine	22
4.2.12	SDS-PAGE	22
4.2.13	Western Blot.....	23
4.2.14	Gelshift-Assays.....	24
4.2.15	Luciferase-Assays	25
4.2.16	β -Glucuronidase-Assays	26
4.3.	Nährmedien	26
4.3.1	<i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	26
4.3.2	Bakterien	27

4.3.3	<i>Botrytis cinerea</i>	28
4.3.4	Petersilie-Zellkultur	28
4.3.5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
4.4.	<i>Arabidopsis thaliana</i>.....	31
4.5.	Petersilie-Zellkultur	31
4.6.	Bakterien-, Hefe- und Pilz-Stämme	32
4.7.	Oligonukleotide und Peptide	33
4.8.	Plasmide	33
4.9.	Verbrauchsmaterialien	34
4.10.	Geräte	35
4.11.	Methoden	35
4.11.1	Manipulation und Erstellung von DNA-Konstrukten	35
4.11.2	Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide	35
4.11.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	36
4.11.4	RNA-Isolation aus <i>A. thaliana</i>	37
4.11.5	Reverse Transkription	37
4.11.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	38
4.11.7	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA	38
4.11.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
4.11.9	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> - und <i>A. tumefaciens</i> -Zellen.....	39
4.11.10	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	40
4.11.11	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	40
4.11.12	Erstellung von Dauerkulturen	41
4.11.13	Sequenzierung von DNA-Molekülen	41
4.11.14	Allgemeine Sequenzanalysen, Alignments etc.	41
4.11.15	Erstellung von T-DNA-Konstrukten zur Herstellung von Reportergenpflanzen	42
4.11.16	Erstellung von Reportergenkonstrukten für die Protoplasten-Transfektion	42
4.11.17	Erstellung von Reportergenkonstrukten für Yeast One-Hybrid-Screenings	43
4.11.18	Klonierung von Transkriptionsfaktoren.....	43
4.11.19	Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression	44
4.11.20	T-DNA-Konstrukte zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren	45
4.11.21	Expression & Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	46
4.11.22	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.11.23	Dialyse.....	48
4.11.24	Western Blot.....	49
4.11.25	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	50

4.11.26	Erstellung Biotin-markierter DNA-Moleküle.....	50
4.11.27	Gelshift-Assay	50
4.11.28	Transformation von Hefe-Zellen.....	52
4.11.29	Plasmidpräparation aus Hefe-Zellen.....	53
4.11.30	Yeast One-Hybrid-Screening	53
4.11.31	Kultivierung der Petersilie-Zellkultur.....	55
4.11.32	Isolation und Transfektion von Petersilie-Protoplasten.....	55
4.11.33	Kultivierung von <i>A. thaliana</i> in Steril- bzw. Erdkultur.....	56
4.11.34	Isolation und Transfektion von <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten.....	57
4.11.35	Transformation und Selektion von <i>A. thaliana</i>	59
4.11.36	Pathogeninfektion von <i>A. thaliana</i>	60
4.11.37	Proteinbestimmung nach Bradford.....	61
4.11.38	Luciferase-Assays	62
4.11.39	Qualitative GUS-Färbungen	63
4.11.40	Quantitative GUS-Assays.....	63
4.11.41	Analyse von Promotorsequenzen mittels POBO	64
5.	Ergebnisse	66
5.1.	Die Pep25-responsive Region in 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 enthält die Kernsequenz der Motivgruppe 27	66
5.2.	30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 vermitteln eine leichte Reportergenaktivität in nicht Pathogen-infizierten <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	71
5.3.	30I-8_M1S1- und 27D-10_M1S2-Pflanzen zeigen bei <i>B. cinerea</i> -Infektion eine leichte Pathogen-Responsivität	75
5.4.	WRKY70, SPL7 und JAG sind potentielle Regulatoren der untersuchten Sequenzen	82
5.5.	Untersuchungen zur Transaktivierbarkeit von 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 durch ihre potentiellen Regulatoren	88
5.6.	Die potentielle SPL7-TFBS in der 30I-8_M1S1-Sequenz ist klonierungsbedingt	93
5.7.	Mutationsanalysen zur Identifikation potentieller WRKY70-TFBS in 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2	95
5.8.	Expression rekombinanter Transkriptionsfaktoren in <i>E. coli</i>	101
5.9.	SPL7 interagiert direkt mit 30I-8_M1S1.....	105
5.10.	WRKY70 bindet die für die Transaktivierung notwendige Sequenz CGACTTTT direkt	106
5.11.	WRKY70 interagiert auch mit weiteren Sequenzen aus Motivgruppe 27	109

5.12.	Die WRKY70-TFBS liegt innerhalb der Pep25-responsiven Region von 30I-8-M1S1	111
5.13.	Die postulierte WRKY70-TFBS ist in möglichen Zielgenen angereichert	112
6.	Diskussion	115
6.1.	Die Interaktion von 30I-8_M1S1 und SPL7 hat keine Relevanz für die Pep25-Responsivität.....	115
6.2.	WRKY70, ein zentraler Regulator der Pathogenantwort, bindet die Sequenz CGACTTTT in 30I-8_M1S1	118
6.3.	Kann ein WRKY-TF aus Petersilie identifiziert werden, der die Pep25-Responsivität von 30I-8_M1S1 vermittelt?	123
6.4.	Sind weitere Faktoren in die Pep25-Responsivität von 30I-8_M1S1 involviert?	124
6.5.	Lässt sich die beobachtete Pathogen-Responsivität in transgenen 30I-8_M1S1-Linien mit der Expression von <i>WRKY70</i> korrelieren?	125
6.6.	Mögliche Ursachen für die ungewöhnliche Bindungsspezifität von WRKY70	128
6.7.	Anhand von Bindungsstudien kann eine Konsensussequenz für die WRKY70-TFBS postuliert werden	131
6.8.	Welche Bedeutung hat die WRKY70-TFBS <i>in vivo</i> ?	133
6.9.	Sind die potentiellen WRKY70-Zielgene Pathogen-responsiv?	135
6.10.	Wie kann die Transaktivierung von 27D-10_M1S2 durch WRKY70 erklärt werden?	136
6.11.	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Ausblick	138
7.	Zusammenfassung	141
8.	Literaturverzeichnis	143
9.	Anhang	153
10.	Materiallisten	221
10.1.	Glycerinkulturen und DNA-Konstrukte	221
10.2.	Primer und Oligonukleotide	228
10.3.	Pflanzensamen	232
11.	Danksagung	235

1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
Bestnr.	Bestellnummer
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
Carb	Carbenicillin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
dpi	days post infection (Tage nach Infektion)
dsOligonukleotid	doppelsträngiges Oligonukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ehem.	ehemals
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und die übrigen Dinge)
ETI	effector triggered immunity (Effektor-ausgelöste Immunität)
ETS	effector triggered susceptibility (Effektor-ausgelöste Empfindlichkeit)
evtl.	eventuell
FU	fluorescence units (Fluoreszenzeinheiten)

Abkürzungsverzeichnis

<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GUS	β-Glucuronidase
h	hours (Stunden)
hpi	hours post infection (Stunden nach Infektion)
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LUC	Luciferase
MAMP	microbe-associated molecular pattern (Mikroben-assoziiertes molekulares Muster)
MTI	MAMP triggered immunity (MAMP-ausgelöste Immunität)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MS	Murashige-Skoog
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
o.ä.	oder ähnliches
o.g.	oben genannte
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated molecular pattern (Pathogen-assoziiertes molekulares Muster)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönliche
pH	potentia Hydrogenii
PP	Protoplasten
PPT	Phosphinotricin
PR	pathogenesis related
pv.	Pathovar
Rif	Rifampicin
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RT-Reaktion	Reverse-Transkriptase Reaktion
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
SA	Salizylsäure
SAR	systemic acquired resistance (systemisch erworbene Resistenz)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssOligonukleotid	einzelsträngiges Oligonukleotid
TATA	TATA-Box (Minimalpromotor)
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
TF	Transkriptionsfaktor(en)
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
X-GlcA	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid)cyclohexyl-Ammoniumsalz
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1: Stufen-Modell der Pflanze-Pathogen-Interaktion.....	2
Abbildung 2: Vorgehensweise und Ergebnisse der bioinformatischen Analysen zur Identifizierung Pathogen-responsiver <i>cis</i> -Elemente	10
Abbildung 3: FBP der Motivgruppe 27	11
Abbildung 4: Pep25-Responsivität der Motivgruppe 27	12
Abbildung 5: Pep25-Responsivität der Mutationen 1-5 der Sequenz 30I-8_M1S1	67
Abbildung 6: Pep25-Responsivität der Mutationen 6-10 der Sequenz 30I-8_M1S1	68
Abbildung 7: Pep25-Responsivität der Mutationen 1- 5 von 27-D10_M1S2.....	69
Abbildung 8: Pep25-Responsivität der Mutationen 6-10 von 27D-10_M1S2.....	70
Abbildung 9: Alignment der 30I-8_M1S1- und 27D-10_M1S2-Sequenzen	70
Abbildung 10: GUS-Färbungen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität in transgenen 30I-8_M1S1-Pflanzen	73
Abbildung 11: GUS-Färbungen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität in transgenen 27D-10_M1S2-Pflanzen	74
Abbildung 12: GUS-Färbungen an <i>B. cinerea</i> infizierten bzw. nicht infizierten Blättern verschiedener 30I-8_M1S1-Linien	76
Abbildung 13: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an <i>B. cinerea</i> infizierten bzw. nicht infizierten 30I-8_M1S1-Pflanzen	77
Abbildung 14: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an <i>Pto</i> DC3000 infizierten bzw. nicht infizierten 30I-8_M1S1-Pflanzen	78
Abbildung 15: GUS-Färbungen an <i>B. cinerea</i> infizierten bzw. nicht infizierten Blättern verschiedener 27D-10_M1S2-Linien.....	79
Abbildung 16: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an <i>B. cinerea</i> infizierten bzw. nicht infizierten 27D-10_M1S2-Pflanzen.....	80
Abbildung 17: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an <i>Pto</i> DC3000 infizierten bzw. nicht infizierten 27D-10_M1S2-Pflanzen.....	81
Abbildung 18: Bestimmung der 3-AT-Konzentration zur Eliminierung des Hintergrundwachstums	83
Abbildung 19: Beispielhaftes Ergebnis der Kolonie-PCR mit positiven Klonen aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 30I-8_M1S1	84
Abbildung 20: Reproduktion der Interaktion zwischen 30I-8_M1S1 und den mittels Yeast One-Hybrid identifizierten TF	85

Abbildung 21: Beispielhaftes Ergebnis der Kolonie-PCR mit positiven Klonen aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 27D-10_M1S2.....	86
Abbildung 22: Reproduktion der Interaktion zwischen 27D-10_M1S2 und JAG.....	87
Abbildung 23: Effekt der WRKY70-Überexpression auf 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2	89
Abbildung 24: Effekt der SPL7-Überexpression auf 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2	90
Abbildung 25: Effekt der JAG-Überexpression auf 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2.....	92
Abbildung 26: Aktivierbarkeit der Mutationen 4 und 6 von 30I-8_M1S1 durch SPL7-Überexpression in Petersilie-Protoplasten	93
Abbildung 27: Aktivierbarkeit der Mutationen 3-10 von 30I-8_M1S1 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten	96
Abbildung 28: Aktivierbarkeit der Mutationen 10-14 von 30I-8_M1S1 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten	97
Abbildung 29: Aktivierbarkeit der Mutationen 4 sowie 10-14 von 30I-8_M1S1 durch WRKY70-Überexpression in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten.....	98
Abbildung 30: Aktivierbarkeit der Mutationen 1 sowie 4-10 von 27D-10_M1S2 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten	100
Abbildung 31: Aktivierbarkeit der Mutationen 11-14 von 27D-10_M1S2 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten	101
Abbildung 32: SDS-PAGE einer SPL7-DBD-Proteinaufreinigung	102
Abbildung 33: SDS-PAGE einer WRKY70-Proteinaufreinigung	104
Abbildung 34: Western Blot zum Nachweis des His-getaggten WRKY70-Proteins.....	105
Abbildung 35: Gelshift-Experiment mit SPL7-DBD	106
Abbildung 36: 30I-8_M1S1 wird spezifisch von WRK70 gebunden.....	107
Abbildung 37: Gelshift-Experiment mit verschiedenen 30I-8_M1S1-Mutationen und WRKY70.....	108
Abbildung 38: Gelshift-Experiment mit WRKY70 und verschiedenen Kompetitoren der Motivgruppe 27.....	110
Abbildung 39: Alignment der durch WRKY70 gebundenen Sequenzen.....	111
Abbildung 40: Mutationen in der WRKY70-TFBS führen zum Verlust der Pep25-Induzierbarkeit.....	112
Abbildung 41: Mittels POBO ermittelte Verteilung der WRKY70-TFBS in WRKY70-responsiven Pseudoclustern.....	113
Abbildung 42: WRKY70 als Regulator der SA/JA vermittelten Pathogenantwort	120
Abbildung 43: Postuliertes allgemeines Sequenzlogo für WRKY-TFBS.....	132

Tabellen

Tabelle 1:	Liste der in pGPTV_bar erstellten Konstrukte	42
Tabelle 2:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 30I-8_M1S1	84
Tabelle 3:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 27D-10_M1S2.....	86
Tabelle 4:	Ergebnisse der t-Tests zwischen den verschiedenen Häufigkeits- verteilungen der YGACTTTT-Sequenz in koregulierten Genen	114

3. Einleitung

3.1. Pflanzen sind einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt

Infektionen durch Phytopathogene stellen neben abiotischen Stressfaktoren wie Trockenheit oder Überflutung eine der größten Bedrohungen für eine Pflanze dar. Weltweit verursachen Pathogeninfektionen Ernteverluste und dadurch großen wirtschaftlichen Schaden (Oerke, 2006). Pflanzen sind ständig einer großen Zahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Die meisten davon sind allerdings keine Phytopathogene, sondern gehen mutualistische oder kommensalistische Interaktionen mit der Pflanze ein (Danhorn und Fuqua, 2007). Die verhältnismäßig kleine Zahl spezialisierter Pathogene, welche einer Pflanze erheblichen Schaden zufügen bzw. diese vollständig abtöten können, besteht u.a. aus Bakterien, Pilzen, Oomyceten und Viren. Weiterhin können z.B. Nematoden, Milben und Insekten durch Fraß Schadsymptome verursachen (Jones und Dangl, 2006). Unter den potentiell pathogenen Mikroorganismen ist wiederum nur eine kleine Zahl spezialisierter Pathogene in der Lage, eine bestimmte Pflanzenart erfolgreich zu infizieren bzw. schädliche Symptome zu verursachen (Jones und Dangl, 2006). Neben physikalischen Barrieren wie Kutikula und Zellwand sind konstitutiv exprimierte, antimikrobielle Metabolite sowie induzierte Abwehrreaktionen der Pflanze für diese Resistenz verantwortlich (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Zu diesen Abwehrreaktionen gehören z.B. die Verstärkung der Zellwand, die Bildung von Phytoalexinen und die Expression von PR (pathogenesis-related)-Genen (Heath, 2000; Jones und Dangl, 2006; Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

3.2. Das pflanzliche Immunsystem

Der Ausgang einer Pflanze-Pathogen-Interaktion, d.h. Resistenz oder Krankheit, ist abhängig von den Komponenten des nativen pflanzlichen Immunsystems und den Virulenzstrategien des Pathogens. Ist das Pathogen gut an das Immunsystem der Pflanze angepasst, kommt es zur Ausbildung der Krankheit. Verfügt die Pflanze aber über die passenden Abwehrmechanismen, so liegt Resistenz vor. Folglich kann die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen als evolutionärer Prozess angesehen werden, bei dem ständiger Selektionsdruck die Virulenz- bzw. Resistenzstrategien beeinflusst. Das aktuell am häufigsten verwendete Modell, um diese Situation zu beschreiben, geht von vier Stufen der Pflanze-Pathogen-Interaktion aus (Abbildung 1, Jones und Dangl, 2006).

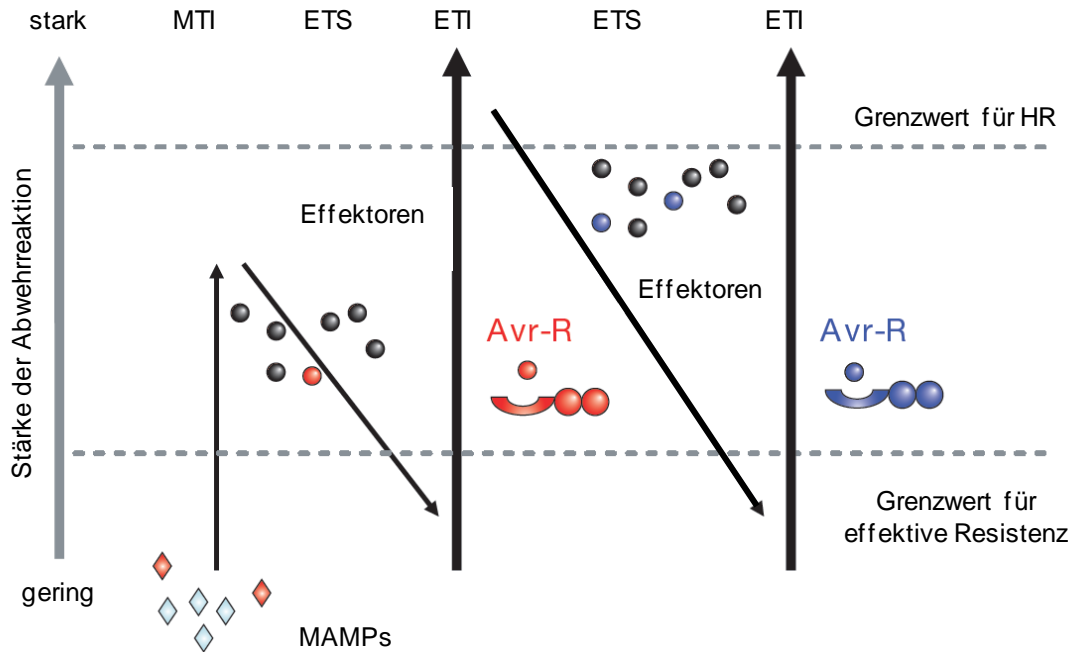


Abbildung 1: Stufen-Modell der Pflanze-Pathogen-Interaktion

Während der MTI werden MAMPs (Rauten) durch pflanzliche PRRs erkannt (rote Rauten). Dies führt zu einer Abwehrreaktion. Spezialisierte Pathogene injizieren Effektoren in die pflanzlichen Zellen, um die MTI zu unterdrücken (ETS). Wird ein Effektor (roter Kreis) durch ein R-Protein erkannt, führt dies zur ETI (meist in Verbindung mit HR). Selektionsdruck kann dazu führen, dass erkannte Effektoren aus dem Effektor-Repertoire des Pathogens deletiert werden und evtl. neue Effektoren entstehen, z.B. durch horizontalen Gentransfer (blaue Kreise). Dies kann wiederum zur ETS führen. Neue oder modifizierte pflanzliche R-Gene können zur Erkennung der neuen Effektoren und zur erneuten ETI führen. Modifiziert nach Jones & Dangl (2006)

Die erste Stufe wird dabei als MTI (MAMP-triggered immunity) bezeichnet. Hierbei werden sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) bzw. MAMPs (microbe-associated molecular pattern) mittels spezieller Rezeptoren (PRRs, pattern recognition receptor) erkannt und eine Resistenzreaktion ausgelöst, die das Pathogenwachstum inhibieren kann (Jones und Dangl, 2006). Spezialisierte Pathogene können diese Resistenzreaktion mittels eigener Virulenzfaktoren (Effektoren) inhibieren, wodurch es zur Ausbildung der Krankheit kommt. Diese Stufe wird als ETS (effector-triggered susceptibility) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006). Resistente Pflanzen haben im Laufe der Evolution sogenannte Resistenz (R)-Proteine entwickelt, die wiederum in der Lage sind, spezifisch einen Effektor auf direktem oder indirektem Weg zu erkennen. Diese Proteine lösen eine Resistenzreaktion aus, die in der Regel stärker ausgeprägt ist als während der MTI und zumeist von lokalem Zelltod (Hypersensitive Reaktion, HR) begleitet wird. Man spricht hier von ETI (effector-triggered immunity, Jones und Dangl, 2006). Pathogene können sich an diese Reaktion wiederum anpassen, indem sie den entsprechenden Effektor aus ihrem Repertoire deletieren bzw. diesen modifizieren und so der Erkennung entgehen oder neue Effektoren bilden, die

eine ETI unterdrücken. Auf der anderen Seite können die Pflanzen im Laufe der Evolution ebenfalls neue R-Gene entwickeln (Jones und Dangl, 2006). Im Folgenden werden die einzelnen Phasen dieser Interaktion und ihre Komponenten näher vorgestellt.

MTI

Bei den während der MTI erkannten MAMPs handelt es sich in der Regel um hoch konservierte molekulare Muster, die sich sowohl in pathogenen als auch in nicht pathogenen Mikroorganismen finden. Diese Muster sind normalerweise besonders stabil vererbt und unterliegen kaum evolutionären Veränderungen. Dadurch wird eine effektive und stabile Erkennung solcher MAMPs durch spezielle Transmembran-Rezeptoren (PRRs, s.o.) ermöglicht (Bent und Mackey, 2007). Beispiele für MAMPs und ihre Rezeptoren in *Arabidopsis thaliana* sind das bakterielle Flagellin und der Rezeptor FLS2, das ebenfalls bakterielle EF-Tu und der Rezeptor EFR1 sowie pilzliches Chitin und CERK1 (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Für viele weitere MAMPs sind die entsprechenden Rezeptoren noch nicht identifiziert. Die bisher charakterisierten Rezeptoren bakterieller MAMPs gehören entweder zur Familie der RLKs (receptor-like kinases) oder RLPs (receptor-like proteins, Segonzac und Zipfel, 2011). Die gut charakterisierten Rezeptoren FLS2 und EFR1 sind LRR (leucin-rich repeat)-RLKs, die eine extrazelluläre Leucin-reiche Domäne und eine intrazelluläre Kinase-Domäne aufweisen (Nicaise *et al.*, 2009). Das *Arabidopsis*-Genom enthält mehr als 600 RLK-Gene, von denen ein Teil potentiell PRRs mit einer Funktion in der MTI darstellen könnte (Shiu, 2004; Jones und Dangl, 2006).

Nach der spezifischen Erkennung eines MAMPs durch einen PRR erfolgt u.a. die Aktivierung von MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Kaskaden, die Depolarisation der Membran, Ca^{2+} -Influx, Aktivierung von NADPH-Oxidasen zur Produktion von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) und die Expression von Genen der Pathogenantwort (Nicaise *et al.*, 2009; Boller und Felix, 2009). Zusammen bewirken diese Reaktionen eine häufig als basale Resistenz bezeichnete Abwehr, die das Wachstum nicht spezialisierter Pathogene verhindern kann. Diese Resistenzreaktion ist im Vergleich zur ETI langsamer und schwächer ausgeprägt (Jones und Dangl, 2006).

Die Erkennung verschiedener MAMPs durch unterschiedliche PRRs führt zu ähnlichen Reaktionen auf transkriptioneller Ebene. So ist z.B. die transkriptionelle Reprogrammierung in *A. thaliana* nach flg22-Applikation (biologisch aktives Peptid aus Flagellin) der Reaktion auf elf26-Applikation (Peptid aus EF-Tu) sehr ähnlich (Zipfel *et al.*, 2006). Auch weitere MAMPs, wie z.B. Chitin, bewirken die Induktion ähnlicher Gengruppen, was zu dem Schluss führt,

dass die unterschiedlichen Eingangssignale während der MTI früh in einen gemeinsamen Signalweg eingespeist werden (Boller und Felix, 2009).

Die Bedeutung der MAMP-Erkennung für die MTI wird anhand der Tatsache deutlich, dass beispielsweise *fls2*-Mutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Sprühinfektionen mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) aufweisen (Zipfel *et al.*, 2004). Es wird dennoch davon ausgegangen, dass der Verlust eines einzelnen Rezeptors in der Regel nicht zu einer signifikant reduzierten Konkurrenzfähigkeit einer Pflanze führt. Dies ist dadurch begründet, dass z.B. die Erkennung bakterieller Pathogene über verschiedene MAMPs erfolgen kann (Flagellin, EF-Tu, Peptidoglykan, etc.), die Erkennung also redundant ist. Pathogene haben verschiedene Effektoren entwickelt, die diese Erkennung blockieren können. Die Redundanz des Systems ist daher umso wichtiger (Boller und Felix, 2009).

ETS

Wie bereits erläutert, führt die MTI zu einer Resistenz gegen die meisten Pathogene. An eine bestimmte Pflanzenspezies angepasste Pathogene können diese Resistenz aber mittels spezieller Effektoren (Virulenzfaktoren) abschwächen oder blockieren. Die Effektoren können dabei z.B. das Wachstum des Pathogens begünstigen, indem sie den Nährstoffausfluss aus der pflanzlichen Zelle beeinflussen oder als strukturelle Komponenten in der Infektionsstruktur (z.B. in der extrahaustorialen Matrix) dienen. Eine direkte Unterdrückung von Komponenten der MTI oder ETI in der pflanzlichen Zelle ist sehr häufig (Jones und Dangl, 2006). Bakterielle Pathogene injizieren ihre Effektoren über ein Typ-III-Sekretionssystem in das pflanzliche Zytoplasma (Boller und Felix, 2009). Beispielsweise blockiert der Effektor HopA11 aus *P. syringae* die flg22-induzierte Callose-Akkumulation, indem er die Phosphorylierung von MAP-Kinasen blockiert (Zhang *et al.*, 2007a). Ein weiterer Effektor aus *P. syringae*, HopF2, interagiert mit RIN4 (RPM1-interacting protein), einem negativen Regulator der MTI in *Arabidopsis*. Diese Interaktion führt zu verbessertem Wachstum des Pathogens in der Pflanze (Wilton *et al.*, 2010). Weitere Arbeiten legen nahe, dass HopF2 neben RIN4 auch zusätzliche Wirtsproteine, die in MTI und ETI involviert sind, beeinträchtigt (Wang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Führt die Wirkung eines Effektors zu einer kritischen Abschwächung der MTI bzw. ETI, so sind die Abwehrreaktionen der Pflanze nicht mehr stark genug, um das Pathogenwachstum effektiv einzugrenzen (Abbildung 1). Dies führt dann zur Ausbildung von Krankheitssymptomen.

ETI

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen sog. R-Gene bzw. R-Proteine erworben, die eine direkte oder indirekte Erkennung eines Effektors ermöglichen. Die durch ein R-Protein er-

kannten Effektoren werden als Avirulenzfaktoren bezeichnet (Jones und Dangl, 2006). Die Mehrzahl der bisher beschriebenen R-Proteine besitzt eine NB (nucleotide binding)- sowie eine LRR (leucine-rich repeat)-Domäne und wird daher als NB-LRR-Proteine bezeichnet. Die meisten der NB-LRR-Proteine tragen am N-Terminus eine TIR-Domäne, die Homologie zum Toll-Interleukin-1-Rezeptor aufweist. Diese werden daher der TIR-NB-LRR-Klasse zugeordnet. TIR-NB-LRR-Proteine weisen große Ähnlichkeit zu Toll-Rezeptoren aus *Drosophila* und Toll-like-Rezeptoren aus Säugetieren auf (Caplan *et al.*, 2008). Da die meisten NB-LRR-Proteine keine Signal-Peptide enthalten, wurde lange davon ausgegangen, dass sie ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert sind. Lokalisierungsstudien konnten allerdings für einige Beispiele das Auftreten in diversen Zellkompartimenten, z.B. im Nukleus, zeigen. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass auch die Avirulenzfaktoren bzw. deren Zielproteine an verschiedensten Stellen lokalisiert sind (Rafiqi *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt, können die NB-LRR-Proteine die Avirulenzfaktoren entweder direkt oder indirekt erkennen. Klassische Beispiele für direkte Interaktion zwischen R-Protein und Avirulenzfaktor stammen aus Flachs (*Linum usitatissimum*). Hier konnten u.a. mittels Yeast Two-Hybrid direkte Interaktionen zwischen R-Proteinen und Avirulenzfaktoren aus einem Rostpilz (*Melampsora lini*) gezeigt werden (Ellis *et al.*, 2007). Diese Interaktionen sind damit Beispiele für die schon 1947 von Flor postulierte Gen-für-Gen-Hypothese, die besagt, dass für jedes Avirulenzgen eines Pathogens ein R-Gen der Pflanze existiert. Die Interaktion zwischen beiden führt zu einer sogenannten inkompatiblen Interaktion, d.h. zur Resistenz der Pflanze. Ist eine der beiden Komponenten nicht vorhanden, führt dies zur Ausbildung der Krankheit (kompatible Interaktion, Flor, 1947). Dieses noch heute aktuelle Konzept ist in das Modell der ETI integriert und um die indirekte Erkennung von Avirulenzfaktoren durch R-Proteine erweitert worden. Die indirekte Erkennung ist in der sog. Guard-Hypothese berücksichtigt, welche besagt, dass R-Proteine wichtige Wirtsfaktoren überwachen und die Modifikation dieser Wirtsfaktoren durch Avirulenzfaktoren detektieren (van der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Eine Erweiterung dieser Hypothese ist das Decoy-Modell, welches besagt, dass Wirtsproteine z.B. nach Genduplikation nur noch als „Köder“ (decoy) dienen, um mit Effektoren (Avirulenzfaktoren) zu interagieren. Diese Interaktion unterliegt dann nur hinsichtlich der eigentlichen Interaktion und Erkennung der Effektor-vermittelten Modifikation des Decoy-Proteins einem Selektionsdruck. Die Erhaltung der Funktion des Wirtsproteins hat ursprünglich einem gegenläufigen Selektionsdruck unterlegen und spielt nun keine Rolle mehr (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Ein Beispiel für die indirekte Erkennung eines Avirulenzfaktors, welches das Decoy-Modell stützt, ist AvrPphB aus *P. syringae* (Block und Alfano, 2011). Die Cystein-Protease AvrPphB kann die PBS1 (AvrPphB susceptible 1)-Kinasen spalten, was wiederum durch das R-Protein RPS5 aus *Arabidopsis* detektiert wird (Ade *et al.*, 2007). *Arabidopsis-pbs1*-Mutanten zeigen keine erhöhte Sensitivität gegenüber *P. syrin-*

gae (Warren *et al.*, 1999). Dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei PBS1 um ein Decoy-Protein handelt. Auch die Tatsache, dass PBS1 ähnliche Kinasen in *Arabidopsis* ebenfalls Ziele von AvrPphB sind und zum Teil eine Rolle in der MTI spielen, unterstützt das Decoy-Modell (Block und Alfano, 2011).

Nach direkter oder indirekter Erkennung eines Avirulenzfaktors durch ein R-Protein wird eine Resistenzreaktion ausgelöst, die deutlich stärker und langanhaltender ist als die MTI (Tsuda und Katagiri, 2010). Viele Aspekte von MTI und ETI ähneln sich dennoch. So gibt es beispielsweise Überlappungen zwischen den in der MTI und den in der ETI induzierten Genen (Navarro *et al.*, 2004). Auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, „oxidative burst“) findet in MTI und ETI statt. Im Gegensatz zur MTI, in der ein kurzer, transients Anstieg der ROS-Produktion unmittelbar nach der MAMP-Erkennung stattfindet, liegt in der ETI ein zweiphasiges ROS-Profil vor. Dabei folgt auf einen kurzen, transienten ROS-Anstieg eine Phase mit hoher, lang anhaltender ROS-Konzentration (Torres *et al.*, 2006). Weiterhin werden sowohl in der MTI also auch in der ETI MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert. Die Kinaseaktivitäten halten während der ETI allerdings länger an (Tsuda und Katagiri, 2010). Ein Prozess der häufig und fast ausschließlich in der ETI auftritt, ist der induzierte, lokale Zelltod (HR) an der Infektionsstelle, der zur Resistenz führen kann (Tsuda und Katagiri, 2010; Coll *et al.*, 2011).

Pathogene können der ETI entgehen, indem sie beispielsweise Effektoren in die Pflanzenzelle injizieren, welche die ETI direkt unterdrücken. Weiterhin kann der Selektionsdruck durch die R-Protein-vermittelte direkte Erkennung eines Avirulenzfaktors zur Selektion von funktionellen Effektoren führen, welche nicht mehr erkannt werden. Avirulenzfaktoren, die nicht direkt erkannt werden, sondern ein durch ein R-Protein überwachtes Wirtsprotein modifizieren, müssen ihre Funktion verlieren bzw. aus dem Effektor-Repertoire deletiert werden. Das Fehlen des Effektors kann dabei wiederum zu reduzierter Virulenz des Pathogens führen (Jones und Dangl, 2006).

3.3. Transkriptionelle Netzwerke in der Pathogenantwort

Ein sehr interessantes Forschungsfeld ist die massive transkriptionelle Reprogrammierung, die während der MTI oder ETI auftritt (3.2). Hierfür wird eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (TF) benötigt, deren Aktivität abhängig von der benötigten Abwehrreaktion reguliert werden muss. Eine wichtige Rolle in dieser Regulation spielen die pflanzlichen Hormone Salizylsäure (SA), Jasmonat (JA) sowie Ethylen (ET, Moore *et al.*, 2011). Um eine schnelle

Reaktion auf eine Pathogeninfektion zu gewährleisten, sind viele Transkriptionsfaktoren bzw. Koregulatoren permanent exprimiert und werden z.B. erst durch die Auslösung von MTI oder ETI aktiviert (Moore *et al.*, 2011).

Mechanismen zur Aktivierung der Regulatoren können dabei z.B. Ca^{2+} - oder Redox-abhängige Aktivierung sowie Phosphorylierungen sein. Weiterhin können auch Mechanismen wie die kontinuierliche Degradierung im Proteasom oder die Bindung von Repressoren an einen TF dafür sorgen, dass dieser inaktiv bleibt solange keine Pathogeninfektion vorliegt (Moore *et al.*, 2011). Ein Beispiel dafür ist das durch SA-Akkumulation aktivierte Protein NPR1 (nonexpresser of PR genes 1). Dieses liegt in seiner inaktiven Form im Zytosol als Oligomer vor (Mou *et al.*, 2003). Durch Pathogeninfektion ausgelöste Änderungen des Redox-Status in der Zelle führen zur Reduktion von Disulfid-Bindungen und damit zur Dissoziation des NPR1-Oligomers (Tada *et al.*, 2008). Die freien Monomere translozieren in den Nukleus und sind dort u.a. an der Regulation der *PR1*-Genexpression beteiligt, indem sie mit TGA-Transkriptionsfaktoren interagieren (Zhang *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel ist der transkriptionelle Aktivator MYC2, der durch JA induziert wird. MYC2 wird durch Proteine aus der JAZ (Jasmonate ZIM-domain) –Familie gebunden und dadurch inaktiviert. Durch Akkumulation von Jasmonaten, z.B. nach Pathogeninfektion, wird eine Ubiquitin-Ligase aktiviert (Skp1-Cullin1-Fbox^{COI1}, SCF^{COI1}), welche die JAZ-Proteine zum Abbau im Proteasom markiert und damit die Aktivierungsdomäne von MYC2 freilegt. MYC2 kann dann die Expression von JA-responsiven Genen aktivieren (Acosta und Farmer, 2010).

Um eine physiologische Antwort auslösen zu können, müssen die Transkriptionsfaktoren in einem umfassenden transkriptionellen Netzwerk zusammen wirken, in welchem sich verschiedene Regulatoren gegenseitig beeinflussen (Moore *et al.*, 2011). Dies wird u.a. durch Kaskaden erreicht, in denen die primären TF Zielgene aktivieren, die wiederum z.T. für TF codieren und weitere Zielgene aktivieren. Die Aktivität der primären TF wird dabei z.B. durch negative Feedback-Regulation weiter moduliert (Moore *et al.*, 2011). Ein Beispiel hierfür ist MYC2, welches nach Derepression durch den SCF^{COI1}-vermittelten Abbau der JAZ-Proteine (s.o.) aktiviert wird und dann unter anderem die Expression eben dieser JAZ-Proteine stimuliert (Chico *et al.*, 2008). Dies kann zur pulsartigen Expression JA-induzierter Gene führen (Banerjee und Bose, 2011). Eine weitere Regulation kann durch gegenseitige Einflüsse antagonistischer Netzwerke erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist der Antagonismus zwischen JA- und SA-vermittelter Genexpression, die sich zumeist gegenseitig reprimiert und so eine Modulation der Pathogenantwort ermöglicht (Vlot *et al.*, 2009; Browse, 2009; Moore *et al.*, 2011).

Transkriptionsfaktoren, welche eine Rolle in der Pathogenantwort spielen, sind z.B. WRKY-Faktoren. Viele Mitglieder dieser TF-Familie sind positive oder negative Regulatoren der Pathogenantwort und werden durch Pathogeninfektion oder MAMP-Behandlung induziert (Eulgem, 2005; Pandey und Somssich, 2009). Autoregulation und negative sowie positive Feedback-Mechanismen tragen dabei zu einer schnellen Aktivierung bzw. einer stringenten Regulation bei (Eulgem, 2005). Ein Beispiel für einen in der Pathogenantwort involvierten WRKY-Faktor ist WRKY33. MPK4 (mitogen-activated protein kinase 4) bildet zusammen mit MKS (mitogen-activated protein kinase substrate) und WRKY33 einen Komplex im Zellkern. Nach flg22-Behandlung wird eine Signaltransduktionskaskade, in die MEKK1, MKK1/2 und MPK4 involviert sind, aktiviert (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012). Durch Phosphorylierung von MKS durch MPK4 wird der oben erwähnte Komplex aufgelöst und WRKY33 freigesetzt (Qiu *et al.*, 2008). Dieser kann dann die Expression von *PAD3* (phytoalexin deficient 3), einem Gen der Camalexin-Synthese, stimulieren. Weitere Transkriptionsfaktor-Familien mit in der Pathogenantwort involvierten Mitgliedern sind z.B. ERF, Myb, TGA, und bZIP (Eulgem, 2005).

Zusätzlich zur sehr komplexen Regulation der Aktivitäten verschiedener TF ist natürlich auch das Auftreten von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) in den Promotoren der zu regulierenden Gene wichtig. Dies ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass viele Gene gleichzeitig durch einen Stimulus aktiviert werden können. Ein Promotor enthält dabei in der Regel verschiedene *cis*-Elemente bzw. TFBS, die in ihrer Gesamtheit zur spezifischen Regulation der Genexpression beitragen. Anhand einiger Beispiele konnte der Einfluss von Kopienzahl, Lokalisierung und Kombination verschiedener *cis*-Elemente auf die Expression von Genen gezeigt werden (Rushton *et al.*, 2002; Narusaka *et al.*, 2003; Mehrotra *et al.*, 2005; Mikkelsen und Thomashow, 2009; Zou *et al.*, 2011). Die an der Regulation beteiligten TF sind in vielen Fällen noch unbekannt. Dies spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass für viele TF bzw. TF-Familien noch keine Bindungsstellen bekannt sind (Bülow *et al.*, 2010). Die Identifikation und Analyse neuer *cis*-Elemente ist Gegenstand aktueller Forschung und kann dazu beitragen neben neuen *cis*-Elementen auch neue transkriptionelle Regulatoren zu identifizieren oder bisher unbekannte Bindungsspezifitäten zu beschreiben.

3.4. Bioinformatische und experimentelle Analysen können zur Identifizierung neuer *cis*-Elemente führen

Eine Möglichkeit, die zur Verfügung stehenden Daten über *cis*-Elemente zu erweitern, sind bioinformatische Analysen. Koschmann *et al.* (2012) haben einen solchen Ansatz gewählt,

um neue *cis*-Elemente in Promotoren von Genen zu identifizieren, die während der Pathogenantwort koreguliert werden (Koschmann *et al.*, 2012). Ziel war es *cis*-Elemente zu identifizieren, die durch ein möglichst breites Spektrum von Pathogenen bzw. MAMPs induziert werden und diese anschließend experimentell zu validieren. Der Schwerpunkt lag dabei auf pilzlichen Pathogenen bzw. Stimuli. Die in der entsprechenden Arbeit verfolgte Strategie basiert auf Microarray-Daten aus *A. thaliana*, die in der Datenbank PathoPlant® (Bülow *et al.*, 2007) annotiert sind. Abbildung 2 a fasst die Vorgehensweise und die wichtigsten Ergebnisse zusammen. Datenbankabfragen mit Kombinationen aus bis zu fünf verschiedenen Stimuli führten zur Identifikation von 510 Gruppen koregulierter Gene. Die Gene einer koregulierten Gruppe sind dabei von allen für die jeweilige Abfrage genutzten Stimuli mindestens um den Faktor zwei induziert. Die Promotoren (1.000 bp vor dem Transkriptionsstart) einer koregulierten Gengruppe wurden mittels spezieller Software auf konservierte *cis*-Sequenzen untersucht (Koschmann *et al.*, 2012). Die Grundannahme dabei ist, dass die koregulierten Gene zum großen Teil durch die gleichen TF reguliert werden und daher auch ähnliche *cis*-Sequenzen tragen sollten. Das Softwarepaket BEST (binding site estimation suite of tools, Che *et al.*, 2005) wurde verwendet, um solche *cis*-Elemente zu identifizieren. BEST kombiniert dabei die Tools MEME, AlignACE, CONSENSUS und BioProspector (Bailey und Elkan, 1995; Roth *et al.*, 1998; Hertz und Stormo, 1999; Liu *et al.*, 2001). Diese können jeweils eigenständig konservierte *cis*-Sequenzen identifizieren. BEST integriert und verfeinert die Ergebnisse dann mittels BioOptimizer (Jensen und Liu, 2004). Das geschilderte Vorgehen führte zur Identifikation von 407 Sequenzmotiven aus den oben genannten 510 koregulierten Gengruppen. Diese Motive wurden mittels STAMP (Mahony und Benos, 2007) auf Grundlage ihrer Ähnlichkeit zueinander in 37 Motivgruppen eingeteilt und ein Stammbaum erstellt (Abbildung 2 b). Es wurde außerdem nach Ähnlichkeiten zwischen den identifizierten Motiven und bereits beschriebenen *cis*-Elementen bzw. TFBS gesucht. Zu diesem Zweck wurden mittels STAMP alle Motive innerhalb einer Motivgruppe zu einem sogenannten „family binding profil“ (FBP) zusammengefasst und diese FBP mit bekannten *cis*-Elementen verglichen. Die meisten der 37 Motivgruppen zeigen keine Ähnlichkeiten zu bereits beschriebenen Sequenzmotiven. Beispielsweise zeigen aber die Gruppen 1 und 7 Ähnlichkeit zur bZIP-TFBS und Gruppe 24 zu ERF-TFBS (Abbildung 2 b). Am interessantesten ist in diesem Zusammenhang Gruppe 27, die große Ähnlichkeit zu W-Box-Sequenzen, den TFBS für WRKY-Transkriptionsfaktoren, zeigt (Koschmann *et al.*, 2012). Wie bereits erwähnt, spielen WRKY-Faktoren eine bedeutende Rolle in der Pathogenantwort und W-Boxen finden sich häufig in Promotoren Pathogen-responsiver Gene. Die Identifikation von W-Boxen mittels der bei Koschmann *et al.* (2012) angewendeten Analysen belegt daher die Funktionalität des bioinformatischen Ansatzes.

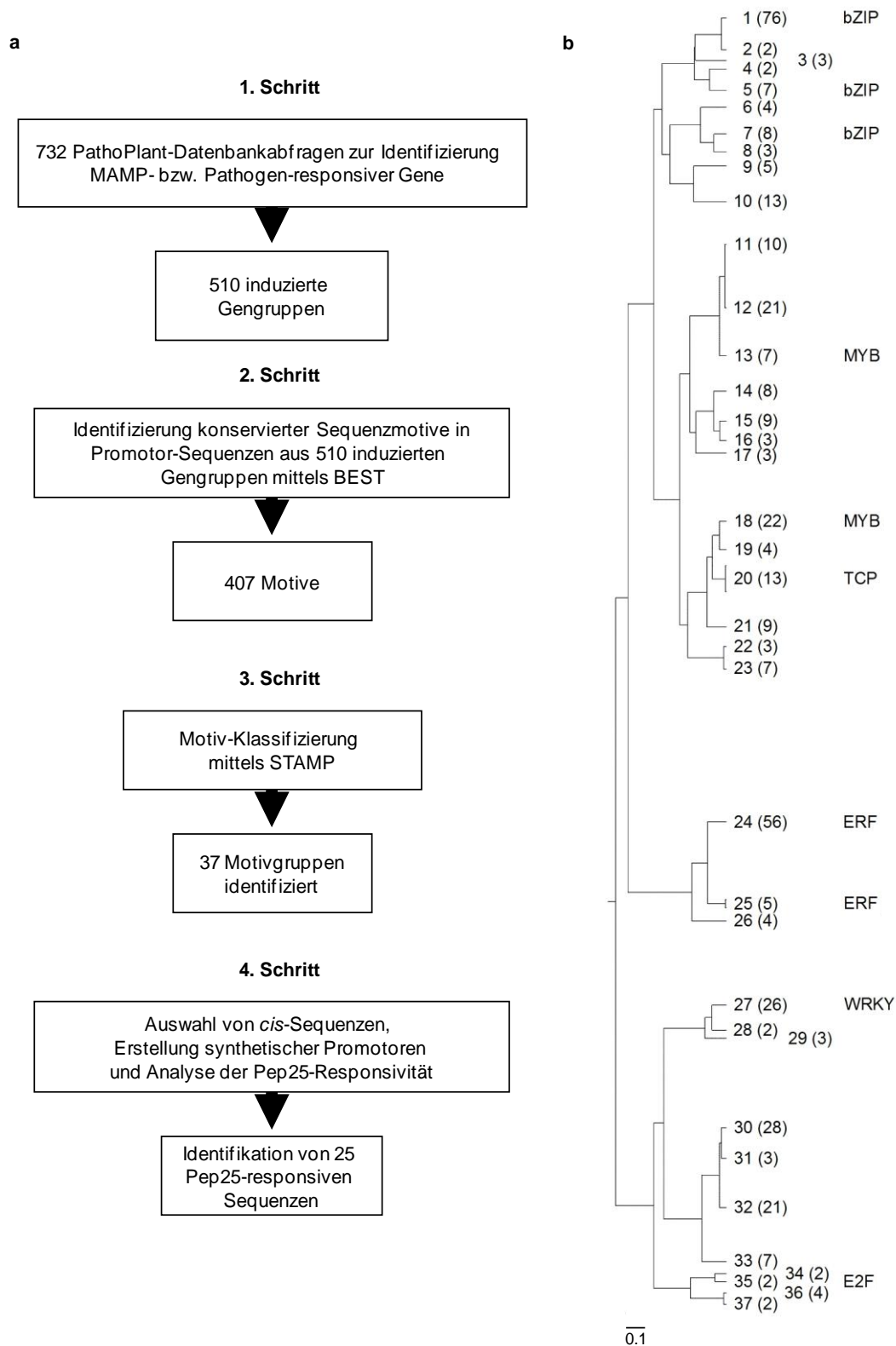


Abbildung 2: Vorgehensweise und Ergebnisse der bioinformatischen Analysen zur Identifizierung Pathogen-responsiver *cis*-Elemente

a) Ablaufschema der bioinformatischen Analysen. Gezeigt sind die einzelnen Arbeitsschritte sowie eine Zusammenfassung der Ergebnisse. b) Gruppierung der identifizierten Motive in 37 Gruppen basierend auf ihrer Ähnlichkeit zueinander. Die Zahl der Motive pro Gruppe ist in Klammern angegeben. Ähnlichkeiten zu bekannten *cis*-Elementen bzw. TFBS sind neben den jeweiligen Gruppen angegeben (z.B. ERF). Abbildungen modifiziert nach Koschmann *et al.* (2012).

Experimentelle Analysen synthetischer Promotoren, die aus Tetrameren einzelner *cis*-Sequenzen bestehen, zeigten, dass viele der bioinformatisch identifizierten Sequenzen in Petersilie-Protoplasten tatsächlich Induktion durch das MAMP Pep25 aus *Phytophthora sojae* vermitteln. Insgesamt sind 25 von 76 untersuchten Sequenzen Pep25-responsiv. Diese stammen aus zehn verschiedenen Motivgruppen (Koschmann *et al.*, 2012).

3.5. Ein neues *cis*-Element in Motivgruppe 27?

Die bereits zuvor erwähnte Motivgruppe 27 beinhaltet 26 verschiedene Sequenzmotive. Das FBP dieser Gruppe (Abbildung 3) weist große Ähnlichkeit zur W-Box Konsensussequenz TTGACY auf (Rushton, 1996; Eulgem *et al.*, 2000; Ciolkowski *et al.*, 2008; Koschmann *et al.*, 2012).



Abbildung 3: FBP der Motivgruppe 27

Sequenzlogo aus allen in Gruppe 27 enthaltenen Motiven. Übernommen aus Koschmann *et al.* (2012)

Von acht untersuchten Einzelsequenzen aus Motivgruppe 27 sind in den oben erläuterten Analysen sieben als Pep25-responsiv identifiziert worden (Abbildung 4, R. Hehl, pers. Mitteilung und Koschmann *et al.*, 2012). Dies ist vor dem Hintergrund, dass die Motivgruppe W-Box-ähnlich ist nicht überraschend, da W-Boxen häufig mit Pathogen-Responsivität assoziiert sind (s.o.). Ein Alignment der responsiven Sequenzen führt aber zu einem interessanten Ergebnis: Alle enthalten einen hoch konservierten Kernbereich mit der Sequenz (G/T)ACTTT(T/C), wobei die Variante GACTTTT in fünf der sieben Sequenzen auftritt (Abbildung 4 b). In nur zwei der Sequenzen (21 und 22) existieren zwei Thymin-Nukleotide vor dieser Kernsequenz, wodurch eine W-Box-Sequenz TTGACT entsteht. Die übrigen Sequenzen tragen in dieser Region keine W-Boxen (Abbildung 4 b). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Motivgruppe 27 möglicherweise ein neues *cis*-Element GACTTTT enthält, welches die Pep25-Responsivität auch in Abwesenheit einer W-Box vermittelt.

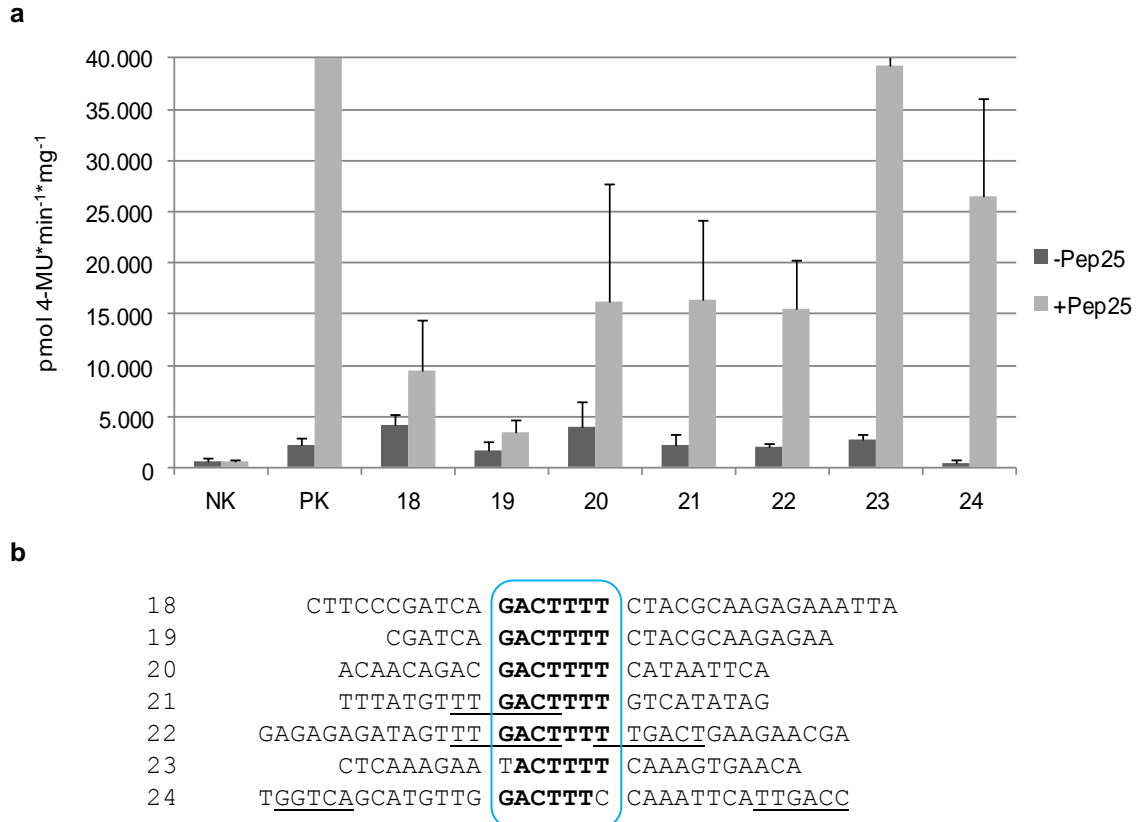


Abbildung 4: Pep25-Responsivität der Motivgruppe 27

a) GUS-Aktivität in den mit entsprechenden Promotor-Reportergenkonstrukten transfizierten Petersilie-Protoplasten mit bzw. ohne Pep25-Behandlung (+/- Pep25). NK: Negativ-Kontrolle, PK: Positiv-Kontrolle. b) Monomer-Sequenzen der potentiellen *cis*-Elemente 18-24. Die potentielle Kernsequenz der Gruppe 27 ist eingerahmt. W-Boxen sind unterstrichen. Nach Koschmann *et al.* (2012)

3.6. Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Hypothese, dass es sich bei der Kernsequenz der Pep25-responsiven Sequenzen aus Gruppe 27 um ein neues funktionelles *cis*-Element handelt, zu überprüfen und ggf. zu untersuchen, welche Transkriptionsfaktoren die *cis*-Sequenz binden. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden zwei *cis*-Sequenzen aus Motivgruppe 27 analysiert. Dabei handelt es sich um die Sequenzen 30I-8_M1S1 (20) und 27D-10_M1S2 (23) mit einer GACTTTT- bzw. TACTTTT-Kernsequenz (Abbildung 4 b). Die übrigen Sequenzen wurden aus den Analysen zunächst ausgeschlossen, da sie entweder nur schwache Pep25-Responsivität vermitteln (Sequenzen 18 und 19) oder eine bzw. mehrere W-Boxen oder W-Box ähnliche Sequenzen tragen (Sequenzen 21, 22 und 24). Es wurden Sequenzen ohne W-Box ausgewählt, da der Einfluss der potentiellen Gruppe 27-Kernsequenz untersucht werden sollte und diese keine W-Box darstellt. Das Auftreten

von W-Boxen, welche durch die, der Kernsequenz benachbarten, Nukleotide entstehen, war daher ein Ausschlusskriterium.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der beiden ausgewählten Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 führte zu interessanten Ergebnissen. Es konnte der Einfluss der potentiellen Kernsequenz auf die Pep25-Responsivität in Petersilie-Protoplasten ermittelt und darüber hinaus gezeigt werden, dass die Sequenzen im homologen System *A. thaliana* eine Pathogen-Responsivität vermitteln. Weiterhin ist die Identifikation eines TF gelungen, der die Pep25- bzw. Pathogen-Responsivität vermittelt.

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien & Enzyme

Standard-Chemikalien wurden in der Regel von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Bei weniger gebräuchlichen Chemikalien wird der Hersteller bzw. die Bezugsquelle angegeben. PEG-4000 für die Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten wurde ausschließlich bei Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bestellt (Bestnr. 81242), da dieses kritisch für hohe Transfektionseffizienzen ist (Yoo *et al.*, 2007).

Restriktionsenzyme sowie häufig verwendete DNA-modifizierende Enzyme (Phosphatase, T4-Ligase etc.) wurden von Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA, ehemals Fermentas) bezogen. Enzyme für speziellere Anwendungen sind jeweils mit ihrer Bezugsquelle angegeben.

4.2. Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit dH₂O angesetzt. Mit Ausnahme einiger allgemein verwendeter Lösungen sind diese sortiert nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet.

TE

10 mM	TRIS aus 1 M Stammlösung, pH 8
1 mM	EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8

LTE

10 mM	TRIS aus 1 M Stammlösung, pH 7,5
0,1 mM	EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8

4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE

2 M	TRIS
1 M	Essigsäure
0,05 M	EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8

10x DNA-Ladepuffer

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylen-Cyanol
25 % (v/v)	Ficoll-400

4.2.2 Antibiotika- und Herbizid-Lösungen

Carbenicillin-Stammlösung

100 mg/ml	Carbenicillin-Dinatriumsalz
-----------	-----------------------------

in dH₂O lösen, bei -20 °C lagern

Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50-100 mg/l

Kanamycin-Stammlösung

100 mg/ml	Kanamycinsulfat
-----------	-----------------

in dH₂O lösen, bei -20 °C lagern

Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50 mg/l

Phosphinotricin-Stammlösung

15 mg/ml	DL-Phosphinotricin
----------	--------------------

in dH₂O lösen, bei -20 °C lagern

Arbeitskonzentration zur Selektion von A. thaliana auf ½ MS-Medium: 30 mg/l

Rifampicin-Stammlösung

50 mg/ml Rifampicin

in DMSO lösen, bei -20 °C lagern

Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50 mg/l

4.2.3 Isolation und Transfektion von Petersilie-Protoplasten

Enzym-Lösung

0,5 % (w/v) Cellulase Onozukara R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

1,08 % (w/v) Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

0,24 M CaCl₂

frisch ansetzen, 2 h rühren und dann sterilfiltrieren

CaCl₂-Lösung

0,24 M CaCl₂

autoklavieren

P5-Medium (1 l)

1x Gamborg B5-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

versetzt mit

10 ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure aus 0,01% (w/v) Stammlösung

96,9 g Saccharose

pH 5,7 mit 1 M KOH einstellen, autoklavieren, dunkel lagern

PEG-Lösung

25 % (w/v) PEG 6000

100 mM Ca(NO₃)₂

45 mM Mannitol

pH 9,0 mit verdünnter KOH einstellen, sterilfiltrieren, in Aliquots bei -20 °C lagern

Ca(NO₃)₂-MES-Lösung

0,275 M	Ca(NO ₃) ₂
2 mM	MES aus 100 mM Stammlösung

pH 6,0 mit KOH einstellen, autoklavieren

Pep25-Lösung

100 µg/ml	Pep25-Peptid
-----------	--------------

bei -20 °C lagern

4.2.4 Isolation und Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten

Enzymlösung

1 % (w/v)	Cellulase Onozukara R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)
0,25 % (w/v)	Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)
20 mM	KCl aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)
20 mM	MES, pH5,7 aus 0,2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

*frisch ansetzen, Enzyme einwiegen und 10 min bei 55°C lösen
auf Raumtemperatur abkühlen und Zugabe von*

10 mM	CaCl ₂ aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)
0,1 %	BSA aus 10 % Stammlösung (sterilfiltriert)

vor Verwendung durch einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porenweite filtrieren

W5

154 mM	NaCl aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)
125 mM	CaCl ₂ aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)
5 mM	KCl aus 2 M Stammlösung (sterilfiltriert)
2 mM	MES, pH5,7 aus 0,2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

frisch ansetzen

MMg

0,4 M	Mannitol aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)
15 mM	MgCl ₂ aus 2 M Stammlösung (sterilfiltriert)
4 mM	MES, pH5,7 aus 0,2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

bei Raumtemperatur lagern

30% PEG-Lösung

30 % (w/v)	PEG 4000 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
0,1 M	CaCl ₂ aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)
0,2 M	Mannitol aus 0,8 M Stammlösung (sterilfiltriert)

frisch ansetzen und maximal drei Tage bei Raumtemperatur aufbewahren

B5-Medium (1 l)

1x	Gamborg B5 Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)
----	---

versetzt mit

79,27 g	Glucose-Monohydrat
30 g	Saccharose
1000 µl	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure aus 0,01% (w/v) Stammlösung
150 µl	6-Benzylaminopurin aus 0,01% (w/v) Stammlösung

pH 5.8 mit 1M KOH einstellen, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

4.2.5 Sterilisation und Aussaat von *Arabidopsis*-Samen

Sterilisierlösung

3 % (v/v)	Natriumhypochlorit
0,1 (v/v)	Triton-X-100

in sterilem dH₂O ansetzen, nicht autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

0,1 % Agaroselösung

0,1 % (w/v) Agarose

in Leitungswasser ansetzen, autoklavieren

4.2.6 Transformation von *A. thaliana*

Inokulationsmedium

5 % (w/v) Saccharose

0,05 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA)

frisch ansetzen, nicht autoklavieren

4.2.7 Transformation von Hefe-Zellen

Lithiumacetat-Lösung

1 M Lithiumacetat

frisch ansetzen, sterilfiltrieren

50 % PEG 3350

50 % (w/v) PEG 3350 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

autoklavieren

Carrier-DNA

2 mg/ml Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

bei 4° C in TE lösen, aliquotieren, bei -20 °C lagern

Zum Denaturieren 5 min in kochendem Wasser erhitzen, dann sofort in Eis-Wasser-Gemisch abkühlen und bis zur Verwendung darin lagern.

4.2.8 Plasmidpräparation aus Hefe-Zellen

Resuspendierungslösung

10 mM	EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8
50 mM	Glucose aus 1 M Stammlösung
25 mM	TRIS aus 1 M Stammlösung, pH 8
150 U/ml	Lyticase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

aliquotieren und bei -20 °C lagern

Denaturierungslösung

0,2 M	NaOH
1 % (w/v)	SDS

Lagerung bei RT

Neutralisierungslösung

3 M	Kaliumacetat
-----	--------------

pH 4,8 mit Essigsäure einstellen

4.2.9 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli*

Silica-Suspension

10 % (w/v)	Siliciumdioxid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
------------	--

In z.B. 50 ml dH₂O einwiegen, 2h absetzen lassen, Überstand verwerfen, Pellet erneut in 50 ml dH₂O suspendieren und nochmals 2 h absetzen lassen. Überstand entfernen, Partikel zu ca. 100 mg/ml in dH₂O suspendieren.

Lagerung bei 4 °C, vor Benutzung gründlich resuspendieren

Lösung A

50 mM	TRIS aus 1 M Stammlösung, pH7,5
10 mM	EDTA
100 mg/l	RNase A

Lagerung bei 4 °C

Lösung B

0,2 M	NaOH
0,1 % (w/v)	SDS

Lagerung bei Raumtemperatur

Lösung C

1,32 M	Kaliumacetat
--------	--------------

pH 4,8 mit Essigsäure einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur

Lösung D

6 M	NaI
-----	-----

Lagerung bei 4 °C, dunkel

Lösung E

50 % (v/v)	Ethanol
10 mM	TRIS aus 1 M Stammlösung pH 7,5
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA

Lagerung bei Raumtemperatur

4.2.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Arbeitslösung

2 ml	5xRoti®-Quant Reagenz (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland)
5,5 ml	dH ₂ O

frisch ansetzen

4.2.11 Aufreinigung His-getaggtter Proteine

NPI-10, NPI-20 etc.

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
10-500 mM*	Imidazol

pH 8,0 mit NaOH einstellen und sterilfiltrieren

**je nach gewünschtem Puffer kann die Imidazol-Konzentration variiert werden. Z.B. 10 mM Imidazol für NPI-10, 20 mM Imidazol für NPI-20 usw.*

4.2.12 SDS-PAGE

5x SDS-Ladepuffer

312,5 mM	TRIS HCl, pH 6,8
3,5 % (w/v)	SDS
50 % (v/v)	Glycerin
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
500 mM	β-Mercaptoethanol

β-Mercaptoethanol frisch dazu geben, Lagerung bei 4 °C

5x TRIS-Glycin-Puffer

125 mM	TRIS
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

vor Gebrauch auf 1x Konzentration verdünnen

Coomassie-Färbelösung (1 l)

60-80 mg Coomassie Brilliant Blue G-250

in 1 l dH₂O, 2-3 h bei Raumtemperatur rühren, dann

3 ml HCl (37 %)

hinzufügen. Lagerung bei RT

4.2.13 Western Blot

10x PBST

1,37 M NaCl
120 mM Na₂HPO₄
27 mM KCl
0,5 % (w/v) Tween-20

pH 7,4 mit HCl einstellen, autoklavieren, vor Gebrauch verdünnen (1x)

Transfer-Puffer

25 mM TRIS
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol

Blocking-Puffer

5 % (w/v) Magermilchpulver

in 1x PBST lösen

Luminol-Stammlösung

250 mM Luminol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

in DMSO lösen, lichtgeschützt bei 4 °C lagern

4-IPBA-Stammlösung

90 mM 4-IPBA (4-Iodo-Phenylboronsäure, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

in DMSO lösen, lichtgeschützt bei 4 °C lagern

Entwicklerlösung 1 (100 ml)

1 ml Luminol-Stammlösung

4,4 ml 4-IPBA-Stammlösung

10 ml 2 M TRIS, pH8,8

ad 100 ml ddH₂O

lichtgeschützt bei 4 °C in Plastikbehälter lagern

Entwicklerlösung 2 (200 ml)

25 mg Na₄(PO₄)x10H₂O

108 µl 30 % H₂O₂

ad 100 ml ddH₂O

mit Phosphorsäure (85 %) ca. pH 4 einstellen

bei 4 °C in Plastikbehälter lagern

4.2.14 Gelshift-Assays

10x Gelshift-Bindungspuffer

100 mM TRIS

500 mM KCl

10 mM Dithiothreitol (DTT)

DTT frisch zugeben, pH 7,5 mit HCl einstellen

5x TBE

450 mM	TRIS
450 mM	Borsäure
10 mM	EDTA

pH 8,3 mit HCl einstellen

4.2.15 Luciferase-Assays

Luciferin-Stammlösung

10 mM	D-Luciferin
25 mM	Glycylglycin, pH7,8

Lagerung bei -20 °C in kleinen Aliquots

LUC-Extraktionspuffer

0,1 M	NaH ₂ PO ₄ , pH7,8
1 mM	Dithiothreitol (DTT) aus 1 M Stammlösung (Lagerung bei -20 °C)

DTT frisch dazu geben

LUC-Reaktionspuffer

15 mM	MgSO ₄
25 mM	Glycylglycin, pH7,8

Lagerung bei -20 °C

Unmittelbar vor Verwendung Zugabe von:

5 mM	ATP, aus 100 mM Stammlösung (Lagerung bei -20 °C)
------	---

LUC-Substratlösung

0,2 mM	Luciferin aus Stammlösung
25 mM	Glycylglycin, pH 7,8

Unmittelbar vor Verwendung herstellen

4.2.16 β -Glucuronidase-Assays

GUS-Extraktionspuffer

50 mM	NaPO ₄ , pH 7
10 mM	Na ₂ EDTA
0,1 % (v/v)	Triton X-100
0,1 % (v/v)	N-Laurylsarcosin
10 mM	β -Mercaptoethanol

β -Mercaptoethanol frisch dazu geben, nicht autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

GUS-Reaktionspuffer

GUS-Extraktionspuffer versetzt mit

1 mM	4-MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid Dihydrat)
------	--

frisch ansetzen

GUS-Färbepuffer

1 mM	X-GlcA (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucoronsäure)
50 mM	NaPO ₄ , pH7
0,1 % (v/v)	Triton-X-100

frisch ansetzen

4.3. Nährmedien

4.3.1 *Arabidopsis*-Pflanzen

$\frac{1}{2}$ MS-Medium (1 l)

2,45 g	Murashige & Skoog Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande)
8 g	Agar

pH 5,9-6 mit KOH einstellen, autoklavieren

4.3.2 Bakterien

LB-Medium (1 l)

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl
15 g	Agar (<i>optional</i>)

autoklavieren

dYT-Medium (1 l)

16 g	Bacto-Trypton
10g	Hefe-Extrakt
5 g	NaCl
15 g	Agar (<i>optional</i>)

autoklavieren

SOC-Medium (1 l)

20 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
584 mg	NaCl
186 mg	KCl
2,033 g	MgCl ₂ *6(H ₂ O)
2,465 g	MgSO ₄ *7(H ₂ O)

pH 6,8-7, mit dH₂O auf 990 ml auffüllen, autoklavieren

Zugabe von

10 ml	2 M Glucose-Lösung (<i>sterilfiltriert</i>)
-------	---

aliquotieren, bei -20 °C lagern

Kings Medium B (KB, 1l)

20 g	Pepton
1,5g	K ₂ HPO ₄
1,5 g	MgSO ₄ *7(H ₂ O)
10 ml	Glycerin
15 g	Agar (<i>optional</i>)

autoklavieren

4.3.3 Botrytis cinerea

Sabouraud Maltose Broth (1 l)

40 g	Maltose
10 g	Pepton

pH 5,6 einstellen, autoklavieren

4.3.4 Petersilie-Zellkultur

Fe-EDTA-Lösung (500 ml)

FeSO ₄ *7H ₂ O	2.780 mg
Na ₂ EDTA	3.730 mg
dH ₂ O ad	500 ml

Lagerung bei 4 °C

2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)-Lösung (500 ml)

2,4-D	50 mg
-------	-------

2,4-D in einem kleinen Volumen Ethanol anlösen, dann mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen.

Lagerung bei 4 °C

Spurenelemente (100 ml)

H ₃ BO ₃	300 mg
MnSO ₄ *H ₂ O	1.120 mg
ZnSO ₄ *7H ₂ O	300 mg
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ *5H ₂ O	39 mg
CoCl ₂ *6H ₂ O	25 mg

ad 100 ml ddH₂O, sterilfiltrieren und in Aliquots lagern

B5-Vitamine (500 ml)

Myo-Inositol	5.000 mg
Nikotinsäure	50 mg
Pyridoxin-HCl	50 mg
Thiamin-HCl	500 mg

ad 500 ml ddH₂O, sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20 °C lagern

HA-Medium (1 l)

KNO ₃	20 ml aus 1,236 M Stammlösung
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,14 ml aus 0,582 M Stammlösung
MgSO ₄ *7H ₂ O	2 ml aus 0,507 M Stammlösung
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 ml aus 0,507 M Stammlösung
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	2 ml aus 0,543 M Stammlösung
KI	1 ml aus 2,25 mM Stammlösung
Fe-EDTA	2,5 ml aus Fe-EDTA Lösung (s.o.)
Spurenelemente	1 ml aus Stammlösung (s.o.)
B5-Vitamine	10 ml aus Stammlösung (s.o.)
2,4-D	10 ml aus Stammlösung (s.o.)
Saccharose	20 g

In ddH₂O auf ca. 700 ml auffüllen, pH 5,5 mit KOH/HCl einstellen. Auf 1.000 ml mit ddH₂O auffüllen. In 40 ml Portionen in 200 ml Erlenmeyer-Kolben autoklavieren (20 min, 121 °C). Sofort nach der Sterilisation aus dem Autoklaven nehmen, auf Raumtemperatur abkühlen und dunkel lagern.

4.3.5 *Saccharomyces cerevisiae*

YPAD-Medium (1 l)

10 g	Hefeextrakt
20 g	Pepton
80 mg	L-Adenin-Hemisulfat
18 g	Agar (<i>optional</i>)

dH₂O ad 950 ml

autoklavieren, dann Zugabe von

50 ml	40% Glucose-Lösung (sterilfiltriert)
-------	--------------------------------------

2x YPAD-Medium (1 l)

20 g	Hefeextrakt
40 g	Pepton
80 mg	L-Adenin Hemisulfat
18 g	Agar (<i>optional</i>)

dH₂O ad 900 ml

autoklavieren, dann Zugabe von

100 ml	40% Glucose-Lösung (sterilfiltriert)
--------	--------------------------------------

SD-Medium (1 l)

6,7 g	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (BD, Franklin Lakes, USA)
je 100 ml	10x Aminosäuren-Mix (bzw. Drop-Out-Mix zur Selektion)
18 g	Agar (<i>optional</i>)

dH₂O ad 950 ml

pH 5,6 mit NaOH einstellen, autoklavieren, dann Zugabe von

50 ml	40% Glucose-Lösung (sterilfiltriert)
-------	--------------------------------------

10x Aminosäuren-Mix (Drop-Out-Mix, 1 l)

Zur Verwendung in Drop-Out-Medien zur Selektion von Plasmiden in Hefe, werden die gewünschten Aminosäuren aus dem untenstehenden Mix weggelassen.

200 mg	L-Adenin Hemisulfat
200 mg	L-Arginin-HCl
200 mg	L-Histidin-HCl Monohydrat
300 mg	L-Isoleucin
1.000 mg	L-Leucin
300 mg	L-Lysin-HCl
200 mg	L-Methionin
500 mg	L-Phenylalanin
2.000 mg	L-Threonin
200 mg	L-Tryptophan
300 mg	L-Tyrosin
200 mg	L-Uracil
1.500 mg	L-Valin

autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

4.4. *Arabidopsis thaliana*

Für die vorliegende Arbeit wurde *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Col-0*) verwendet. Die Samen lagen bereits im Labor vor (R. Hehl, pers. Mitteilung).

4.5. Petersilie-Zellkultur

Zur Isolation und Transfektion von Petersilie-Protoplasten (4.11.32) wurde die Kallus-Kultur Pc 5/3 von *Petroselinum crispum* verwendet (zur Verfügung gestellt von Imre Somssich, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln). Die Kultivierung der Flüssigkultur ist in Abschnitt 4.11.31 beschrieben.

4.6. Bakterien-, Hefe- und Pilz-Stämme

Agrobacterium tumefaciens

Zu Transformationszwecken wurde der nicht onkogene *A. tumefaciens*-Stamm C58C1 verwendet (Deblaere *et al.*, 1985). Dieser trägt das entwaflnete Ti-Plasmid pGV2260. Die Selektion erfolgt auf Rifampicin (50 mg/l) und Carbenicillin (50 mg/l).

Botrytis cinerea

Der Laborstamm *Botrytis cinerea* B05.10 wurde von Paul Tudzynski (Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Escherichia coli

Für die vorliegende Arbeit wurden die *E. coli*-Stämme XL1 Blue MRF' (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland), INVαF' und TOP10 (beide Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) für Klonierungsarbeiten verwendet. Der *E. coli*-Stamm M15 [pREP4] (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde zur Expression His-getaggtter rekombinanter Proteine verwendet.

Pseudomonas syringae* pv. *tomato

Die verwendeten *P. syringae* pv. *tomato*-Stämme beruhen auf dem Isolat *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, welches eine natürliche Rifampicin-Resistenz trägt. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme tragen allerdings zusätzlich noch den Expressionsvektor pVSP61 (vermittelt Kanamycin-Resistenz). Der virulente Stamm trägt nur den leeren Vektor pVSP61empty (*Pto* DC3000 pVSPempty), während der avirulente Stamm das Avirulenzgen *avrRPM1* exprimiert (*Pto* DC3000 *avrRPM1*), welches durch das Resistenzgen *RPM1* in *A. thaliana Col-0* erkannt wird (Dangl *et al.*, 1992). Beide Stämme wurden von Dr. Jane Parker (Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt.

Saccharomyces cerevisiae

Der *S. cerevisiae*-Stamm Y1HGold (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde für die Durchführung von Yeast One-Hybrid-Screenings verwendet.

4.7. Oligonukleotide und Peptide

Primer und Oligonukleotide für PCR-Anwendungen bzw. Klonierungen wurden bei Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Für Klonierungszwecke wurde, falls nötig, eine 5'Phosphorylierung und HPLC-Aufreinigung angefordert. Für Standardanwendungen waren entsalzte Oligonukleotide ohne weitere Aufreinigung ausreichend. Eine Materialliste mit allen verwendeten Oligonukleotiden befindet sich am Ende dieser Arbeit.

Das Peptid Pep25 wurde bei SeqLab (Göttingen, Deutschland) synthetisiert. Die Aminosäure-Sequenz lautet DVTAGAEVWNQPVRGFKVYEQTEMT.

4.8. Plasmide

Die folgenden Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet. Die entsprechenden Labornummern sind in der Materialliste am Ende der Arbeit aufgeführt.

p70S-Luc: Reportergenvektor mit doppeltem 35S-CaMV-Promotor (pers. Mitteilung D. Stahl, KWS Saat AG)

pBT10-GUS: Vektor zur Erstellung von Promotor-GUS-Konstrukten (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000)

30I-8_M1S1-pBT10GUS, 27D-10_M1S2-pBT10GUS und 4xD-pBT10GUS sind Derivate dieses Vektors und tragen die *cis*-Sequenzen 30I-8_M1S1, 27D-10_M1S2 und 4xD (vgl. Koschmann *et al.* (2012))

pBT10-GUS-d35SLUC (pBT10GUS/LUC): Derivat des pBT10GUS-Vektors, das ein konstitutiv exprimiertes LUC-Gen trägt (Koschmann *et al.*, 2012).

30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC und 27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC tragen die *cis*-Sequenzen 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 als Tetramere zwischen den *SpeI/XbaI*-Schnittstellen des Vektors (Koschmann *et al.*, 2012).

pCR2.1- und pCR4Blunt-TOPO: Klonierungsvektoren (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)

pGPTV_bar: T-DNA-Vektor mit GUS-Reportergen und Phosphinotricin-Resistenzgen zur Selektion transgener Pflanzen (Becker *et al.*, 1992)

35S-pGPTV_bar: Derivat von pGPTV_bar mit 35S-Promotor vor dem GUS-Reportergen

pHis2.1: Bait-Vektor für Yeast One-Hybrid-Screenings (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

pORE-O2: T-DNA-Vektor mit Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion transgener Pflanzen (Coutu *et al.*, 2007)

pQE30, pQE31, pQE32: Expressionsvektoren zur rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* (Qiagen, Hilden, Deutschland)

pRT101-LUC: Reportergenvektor mit konstitutiv exprimiertem LUC-Gen (Maas *et al.*, 1991)

4.9. Verbrauchsmaterialien

Plastikmaterialien wie z.B. Eppendorfgefäße und Petrischalen wurden in der Regel von Firma Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) bestellt. Weniger gebräuchliche Materialien sind im entsprechenden Protokoll mit den Herstellerangaben versehen.

Time Tape (Precision Dynamics Corp., Valancia, Kalifornien) sowie Scotch® Magic™ Tape (3M France, Cergy Pontoise Cedex, Frankreich) für die Isolation von *Arabidopsis*-Protoplasten wurden über Carl Roth GmbH & CO. KG (Karlsruhe, Deutschland) unter den Bestellnummern 7987.1 bzw. 4824.1 bezogen.

Nylon-Siebgewebe (Maschenweite 60 µm) für die Filtration der *Arabidopsis*-Protoplasten wurde bei W. O. Schmidt GmbH Laboratoriumsbedarf (Braunschweig, Deutschland) gekauft.

4.10. Geräte

Neben gängigen Laborzentrifugen, Inkubatoren etc. kamen die folgenden spezielleren Geräte zum Einsatz

Elektroporator, Gene Pulser® II', Bio-Rad Laboratories

Gel-Dokumentationsgerät, Geldoc XR, Bio-Rad Laboratories

Horizontale Gelelektrophoreseapparaturen, Biozym

Lichtschränk, CU-32L und CU-36L/4, Percival Scientific

Mikrotiterplatten-Leser, TriStar LB 941, Berthold Technologies

Nano Photometer™ (7122V1.6.1), Implen

PCR-Thermocycler, Mastercycler, Eppendorf

Photometer, Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech

Überkopf-Schüttler, LD79-015, Labor Brand

Ultraschall-Homogenisator, Labsonic U, B. Braun Biotech International

UV-Crosslinker, Stratalinker, Stratagene

Vakuumpumpe, High Vacuum Pump E1M5, Edwards

Vertikale Gelelektrophoreseapparatur, MiniProtean Tetra System, Bio-Rad Laboratories

4.11. Methoden

4.11.1 Manipulation und Erstellung von DNA-Konstrukten

Arbeiten zur Manipulation und Klonierung von DNA/RNA-Molekülen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook und Russell, 2001) bzw. entsprechend der Herstellerangaben des jeweiligen Enzyms durchgeführt

4.11.2 Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide

Zum Annealing einzelsträngiger Oligonukleotide zu doppelsträngigen Molekülen wurden die komplementären Einzelstränge in einer Konzentration von typischerweise je 100 µM im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Proben wurden kurz auf 95 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die dabei entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle wurden für Klonierungen oder Gelshift-Experimente weiter verwendet.

4.11.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von Zielsequenzen aus genomischer DNA, Plasmiden oder cDNA wurden in der Regel PCR-Ansätze von 25 µl Endvolumen angesetzt. Der verwendete PCR-Puffer und die Polymerase variieren je nach Anwendung bzw. nach Hersteller und wurden gemäß Herstellerempfehlungen verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	10x PCR-Puffer
2 µl	dNTP-Mix (2,5 mM pro dNTP)
1 µl	Primer 1 (20 µM)
1 µl	Primer 2 (20 µM)
17,25 µl	ddH ₂ O
1 µl	Template DNA (0,1-1 ng Plasmid, 0,1-1 µg gDNA)
0,25 µl	Polymerase (5 U/ µl)
25 µl	Endvolumen

Zur Amplifikation der gewünschten Produkte wurde ein PCR-Programm durchlaufen, welches wie folgt aufgebaut war:

95 °C 3 min

30-35x

95 °C 30 s

55 °C 30 s *

72 °C 1 min **

72 °C 2-5 min

4 °C ∞

* Die Annealingtemperatur variiert je nach Primerpaar. Zumeist wurde das Annealing bei 55 °C ausgeführt, abweichende Temperaturen sind in der Primerliste (Anhang) vermerkt.

** Die Elongationszeit variiert je nach Länge des Amplifikates. Üblicherweise wurde 1 min/kb gewählt. Die Elongationstemperatur richtet sich nach dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms und wurde entsprechend der Herstellerangaben gewählt.

Für PCRs bei denen eine hohe Amplifikationsgenauigkeit nötig war (z.B. für Klonierungen), wurde die PeqGold PWO-DNA-Polymerase (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Für PCRs bei denen gleichzeitig eine erhöhte Sensitivität und hohe Genauigkeit nötig war, wurde der Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ebenfalls nach Herstellerprotokoll verwendet.

Je nach Applikation wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel analysiert oder z.B. zur weiteren Klonierung in einen Restriktionsverdau eingesetzt. Aufreinigung von PCR-Produkten, z.B. für die Sequenzierung, wurden mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Kolonie-PCR mit *E. coli* bzw. Hefe-Zellen

Zur PCR-Analyse von einzelnen *E. coli*-Kolonien (Kolonie-PCR) wurde die betreffende Kolonie mit einer Pipettenspitze berührt, die anhaftenden Zellen in 20 µl 10 mM NaOH suspendiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1-2 µl der Lösung in eine PCR-Reaktion eingesetzt (s.o.)

Zur Analyse von einzelnen Hefe-Klonen wurde eine Streichholzkopf-große Menge der entsprechenden Kolonie in 50 µl TE mit Lyticase (50 U/ml, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) suspendiert und für 30 min bei 37 °C und anschließend 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden 5 µl in eine PCR mit 50 µl Endvolumen eingesetzt.

4.11.4 RNA-Isolation aus *A. thaliana*

Zur Isolation von RNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen wurde das „NucleoSpin RNA Plant“ Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) den Herstellervorgaben entsprechend verwendet. Als Lysispuffer wurde der mitgelieferte RA1-Puffer verwendet. Die Quantität und Qualität der RNA wurde mittels photometrischer Messung (4.11.6) und Gelelektrophorese überprüft (4.11.7).

4.11.5 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte mit dem „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Die wie unter 4.11.4 isolierte RNA wurde in der gewünschten Menge (üblicherweise 1 µg) entsprechend dem Herstellerprotokoll in die Reaktion eingesetzt. Dabei wurde der mitgelieferte Oligo(dT)

Primer verwendet. Die Erststrang-cDNA wurde entweder direkt weiter in eine PCR eingesetzt (1 µl für einen 25 µl PCR-Ansatz, 4.11.3) oder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.11.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde ein Nano Photometer (Implen, München, Deutschland) verwendet. Dazu wurde von 5 µl der Lösung ein UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. Aus der OD_{260} ergibt sich die DNA- bzw. RNA-Konzentration ($OD_{260}=1$ entspricht 50 µg/ml dsDNA, 20 µg/ml Oligonukleotid bzw. 40 µg/ml RNA). Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über Proteinverunreinigungen und sollte größer als 1,8 sein, während das Verhältnis OD_{260}/OD_{230} den Anteil an weiteren Verunreinigungen, wie z.B. Phenol und Guanidin-HCl, anzeigt und möglichst größer als 2,0 sein sollte.

4.11.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Zur Herstellung von Agarosegelen für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Lösungen von 0,7% bis 2% (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer hergestellt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Temperierung auf ca. 60 °C erfolgte im Wasserbad. Anschließend wurde die Lösung mit 1/10.000 Volumen Ethidiumbromid (10 mg/ml) in einen Gelträger gegossen, ein Kamm eingesetzt und das Gel ausgehärtet. Zu analysierende DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer gemischt, in die Geltaschen geladen und in 1x TAE Laufpuffer bei 6-8 V/cm aufgetrennt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und anhand der auf dem Gel aufgetragenen Größenstandards analysiert (GeneRuler 1 kb DNA Ladder bzw. MassRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

1,5 % Gele zur Analyse von Gesamt-RNA wurden ebenfalls in 1x TAE hergestellt. Diese Gele wurden stets frisch angesetzt und die entsprechenden Gelträger sowie die Gelkammer vor der Verwendung mit 0,1 % SDS-Lösung gewaschen und mit dH₂O gespült. Zum Laden der Gele wurde ein Volumen „2x RNA Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) zu den Proben gegeben, 5 min bei 70 °C erhitzt und nach Abkühlen auf Eis auf das Gel geladen. Als Größenstandard wurde „Ribo Ruler High Range RNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die

Elektrophorese erfolgte in 1x TAE bei ca. 5 V/cm. Die anschließende Dokumentation erfolgte, wie bei DNA-Gelen, unter UV-Licht.

4.11.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerprotokoll verwendet. Sehr große DNA-Fragmente wurden mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

4.11.9 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*- bzw. *A. tumefaciens*-Zellen für die Elektroporation, wurde der jeweilige Stamm zunächst auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht (*E. coli*) bzw. bei 25 °C für 48 h (*A. tumefaciens*) wurden 5 ml dYT-Medium ohne Antibiotikum aus einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln inkubiert (37 °C bzw. 25 °C). Die Vorkultur wurde in 400 ml dYT-Medium überführt und so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 erreicht war. Die Kultur wurde anschließend 30 min auf Eis gekühlt, für 30 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 400 ml kaltem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Im Folgenden wurden diese Schritte dann nochmals mit 200 ml bzw. 10 ml 10 % Glycerin wiederholt. Im letzten Schritt wurden die Zellen in 1 ml 10 % Glycerin resuspendiert, 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der benötigten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl der zu transformierenden DNA (z.B. Ligation) gemischt. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette überführt und bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF transformiert (GenePulser II, BioRad, München, Deutschland). Für die Elektroporation von *A. tumefaciens* wurde der Widerstand auf 400 Ω erhöht. Sofort nach der Elektroporation wurden 500 µl SOC-Medium in die Kuvette gegeben. Es folgte eine Inkubation unter Schütteln (1h, 37 °C bzw. 1,5 h 25 °C bei *A. tumefaciens*), bevor bis zu 150 µl des Transformationsansatzes auf LB-Medium mit den benötigten Antibiotika plattiert wurden. Die Platten wurden dann bei 37 °C über Nacht, bzw. bei 25 °C für zwei Tage (*A. tumefaciens*) inkubiert.

4.11.10 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für Hitzeschock-Transformation wurden die benötigten Zellen aus LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert, bei 37 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag eine ü.N. Kultur in dYT (2 ml, mit Antibiotika) angeimpft. Mit 100 µl dieser Vorkultur wurden 100 ml vorgewärmtes dYT-Medium (ohne Antibiotikum) inokuliert und solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,8 erreicht war. Die Kultur wurde in einem Eis-Wasser-Gemisch für 10 min abgekühlt und dann in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert (2.000 g). Im Anschluss wurden die Pellets in je 25 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation wurde dann wiederholt, die Zellen in je 5 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl der kompetenten Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende Hitzeschock wurde für genau 2 min bei 42 °C im Wasserbad ausgeführt. Danach erfolgte die Zugabe von 800 µl SOC-Medium, Inkubation unter Schütteln bei 37 °C für 1 h und das Ausplattieren von bis zu 150 µl Transformationsansatz auf LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum.

4.11.11 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Plasmid-Isolationen wurden je nach benötigter Menge DNA entweder aus kleinem Volumen (Mini-Präparation) oder als Midi- bzw. Maxi-Präparationen durchgeführt. Die beiden zuletzt genannten wurden nach Herstellervorgaben mit folgenden Kits ausgeführt:

- NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus kleinem Kulturvolumen kam entweder das „EasyPrep Pro“ Kit (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) oder die folgende Methode nach Li *et al.* (2010) zum Einsatz:

Für die Plasmidpräparation wurden 5 ml Kulturen der entsprechenden Klone in LB-Medium mit den passenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert (15.000 g, 30 s), der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl Lösung A resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µl Lösung B und 2 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Lyse der Zellen. Im Anschluss wurden 100 µl Lö-

sung C hinzu gegeben und nach vorsichtigem Mischen die Zelltrümmer mittels 5 min Zentrifugation (15.000 g) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl Lösung D gemischt und 20 µl Silica-Suspension (s.o.) zugegeben. Die DNA-Bindung an die Silica-Partikel erfolgte während 2-5-minütiger Inkubation bei RT. Durch Zentrifugation (15.000 g, 10 s) wurden die Partikel pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in 500 µl Lösung E gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Waschschrift wiederholt. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet kurz getrocknet und dann in 40 µl dH₂O aufgenommen. Durch Inkubation bei 70 °C für 2 min wurde die Plasmid-DNA von den Silica-Partikeln gelöst und die Partikel durch Zentrifugation abgetrennt (2 min, 15.000 g). Der Plasmid-haltige Überstand wurde bis auf einen Rest von 4 µl vollständig abgenommen und hatte typischerweise eine Konzentration von 100-200 ng/µl.

4.11.12 Erstellung von Dauerkulturen

Zur Erstellung von Dauerkulturen von *E. coli*-, *A. tumefaciens*- und *P. syringae*-Stämmen wurden 700 µl einer gut bewachsenen Flüssigkultur in entsprechendem Medium mit 300 µl Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Für Dauerkulturen von Hefe-Zellen wurde eine frische Kolonie des entsprechenden Stammes in 300-500 µl YPAD oder SD-Flüssigmedium aufgenommen und Glycerin zu einer Endkonzentration von 25 % (v/v) zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Suspension bei -80 °C gelagert.

Sporen von *B. cinerea* wurden, wie unter (4.11.36) beschrieben, in Sabouraud Maltose Broth geerntet, 250 µl dieser Suspension mit 750 µl Glycerin gemischt und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

4.11.13 Sequenzierung von DNA-Molekülen

Sanger-Sequenzierungen von Plasmiden bzw. PCR-Produkten wurden bei GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) in Auftrag gegebenen. Die digital übermittelten Daten wurden mit der Software CLC Main Workbench (CLC Bio, Aarhus, Dänemark) ausgewertet.

4.11.14 Allgemeine Sequenzanalysen, Alignments etc.

Zur Verarbeitung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie für Alignments, Erstellung von Vektorkarten, Primern etc. wurde die kommerzielle Software CLC Main Workbench

(CLC bio, Aarhus, Dänemark) verwendet. DNA- und Proteinsequenzen wurden in der Regel über www.arabidopsis.org oder www.ncbi.nlm.nih.gov bezogen. Speziellere bioinformatische Analysen wurden mittels weiterer Tools durchgeführt, welche im jeweiligen Zusammenhang angegeben werden.

4.11.15 Erstellung von T-DNA-Konstrukten zur Herstellung von Reportergermpflanzen

T-DNA-Konstrukte zur Erstellung von Reportergermpflanzen wurden im Vektor pGPTV_bar (Becker *et al.*, 1992) erstellt. Dazu wurden Tetramere von *cis*-Elementen aus bereits vorhandenen pBT10-GUS-Konstrukten mittels PCR (mit Proofreading-Polymerase) amplifiziert (Primer MS23_left_HindIII_new & MS23_right_SmaI), das PCR-Produkt mit *HindIII* und *SmaI* gespalten und in den ebenso gespaltenen und dephosphorylierten Vektor ligiert (Tabelle 1). Nach Transformation in *E. coli* wurden die entsprechenden Konstrukte durch Sequenzierung verifiziert, in *A. tumefaciens* transformiert und für die Erstellung transgener *A. thaliana*-Pflanzen verwendet (4.11.35).

Tabelle 1: Liste der in pGPTV_bar erstellten Konstrukte

<i>cis</i> -Sequenz	pBT10-GUS-Konstrukte (DNA/Glycerinkultur*)	erhaltenes Konstrukt
TATA-Box	4914/3173	TATA_pGPTV_bar
4xD	6430/4380	4xD_pGPTV_bar
30I-8_M1S1	4665/3089	30I-8_M1S1_pGPTV_bar
27D-10_M1S2	5136/3504	27D-10_M1S2_pGPTV_bar

* interne Labornummern

4.11.16 Erstellung von Reportergermkonstrukten für die Protoplasten-Transfektion

Neue Reportergermkonstrukte für die Transfektion von Petersilie-Protoplasten, die zusätzlich zu den bei Koschmann *et al.* beschriebenen erstellt wurden, wurden direkt im Vektor pBT10GUS-d35SLUC (Koschmann *et al.*, 2012) kloniert. Das Vorgehen war dabei wie folgt: Einzelsträngige, phosphorylierte Oligonukleotide mit den zu klonierenden Sequenzen wurden annealt (4.11.2) und mittels dabei entstehender *SpeI*- bzw. *SacI*-Überhänge in den *SpeI*/*SacI* geschnittenen und dephosphorylierten pBT10GUS/LUC-Vektor kloniert. Klone, die das Insert in der gewünschten Orientierung trugen, wurden ausgewählt, das Plasmid präpariert und in

zwei separate Spaltungen eingesetzt. Aus einer *SpeI/SacI*-Spaltung wurde das ca. 2 kb-Fragment, welches das *uidA* (GUS)-Gen mit dem vorgeschalteten Insert enthält, aufgereinigt. Weiterhin wurde aus einer *XbaI/SacI*-Spaltung das ca. 5 kb-Fragment mit dem Vektorrückgrad und dem Insert aufgereinigt. Beide Fragmente wurden ligiert, wobei ein vollständiger pBT10GUS/LUC-Vektor mit zwei Kopien des Inserts entstand. Eine Wiederholung dieses Vorgehens führte zu Tetrameren des Inserts, welche durch Sequenzierung überprüft wurden. Die entsprechenden Konstrukte wurden für die Transfektion von *Petersilie*-Protoplasten genutzt.

Für Experimente mit *Arabidopsis*-Protoplasten ist der pBT10GUS/LUC-Vektor nicht geeignet (Umrath, 2012). Daher wurden die entsprechenden *cis*-Sequenzen aus pBT10GUS/LUC in den pBT10GUS-Vektor (Sprenger-Haussels und Weisshaar, 2000) umkloniert. Dazu wurde die gesamte Promotor-GUS-Kassette aus pBT10GUS/LUC mittels *EcoRI/SacI*-Spaltung ausgeschnitten, aufgereinigt und in den analog behandelten pBT10GUS-Vektor ligiert. Die so erhaltenen Plasmide konnten nach Verifikation durch Sequenzierung für die Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten genutzt werden.

4.11.17 Erstellung von Reportergenkonstrukten für Yeast One-Hybrid-Screenings

Die Reportergenkonstrukte (Bait-Konstrukte) für das Yeast One-Hybrid Screening wurden im Vektor pHis2.1 erstellt. Dazu wurden die entsprechenden *cis*-Sequenzen aus dem pBT10-GUS-Vektor (vgl. Tabelle 1) mittels Proofreading-Polymerase amplifiziert. Die verwendeten Primer Bait_l und Bait_r umschließen die *cis*-Sequenz in pBT10-GUS. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit *EcoRI/SacI* geschnitten, in den entsprechend geschnittenen pHis2.1-Vektor ligiert, transformiert und durch Sequenzierung überprüft.

4.11.18 Klonierung von Transkriptionsfaktoren

WRKY70

Zur Klonierung von *WRKY70* wurde die cDNA aus *Arabidopsis* mittels RT-PCR amplifiziert. Die RNA wurde dazu aus Col-0-Pflanzen isoliert, welche acht Stunden zuvor mit 2 mM SA besprüht wurden. Nach einer RT-Reaktion (4.11.5) folgte die Amplifikation der *WRKY70*-cDNA mittels der Primer AtWRKY70 -02 f und AtWRKY70 1061r, wobei die *peqGOLD* Pwo-DNA-Polymerase (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) zum Einsatz kam (4.11.3). Das PCR-Produkt wurde anschließend gemäß Herstellerprotokoll des „Zero Blunt®

TOPO® Cloning Kit for Sequencing“ (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in pCR4Blunt-TOPO kloniert. Nach Verifikation des Klons durch Sequenzierung konnte mittels der in den Primern enthaltenen *Bam*HI/*Kpn*I-Schnittstellen eine Subklonierung vorgenommen werden.

SPL7

Die *SPL7*-cDNA wurde mit den Primern *SPL7_fwd2* und *SPL7_rev2* aus *Arabidopsis*-cDNA amplifiziert. Dazu wurde der Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet, der einen Anteil an Proofreading-Polymerase enthält. Eine Amplifikation mittels reiner Proofreading-Polymerase ist nicht gelungen. Das 2,3 kb große PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben mittels des „TA Cloning Kit“ (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in den Vektor pCR2.1 kloniert. An einigen Positionen der so klonierten *SPL7*-cDNA treten im Vergleich zur theoretisch erwarteten Sequenz Nukleotidaustausche auf. Dabei handelt es sich in fast allen Fällen um stille Mutationen, welche die Aminosäuresequenz nicht verändern. An einer Position (Position 89) kommt es zum Austausch von Arginin (R) zu Glutamin (Q), außerdem ist an Position 242 ein Alanin vorhanden, welches sich in der bei NCBI hinterlegten Proteinsequenz (NP_197384.1) nicht findet (Anhang 1). Beide Veränderungen liegen außerhalb der DNA-Bindungsdomäne (SBP-Domäne, Aminosäuren 137-215) und haben daher sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Bindungsspezifität.

JAG

Die *JAG*-cDNA wurde mit den Primern *JAG cDNA fwd234* und *JAG cDNA rev963* direkt aus der TFonly cDNA-Bank amplifiziert, da eine Amplifikation aus *A. thaliana*-cDNA nicht erfolgreich war. Das PCR-Produkt wurde entsprechend den Herstellerangaben des „Zero Blunt® TOPO® Cloning Kit for Sequencing“ (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in pCR4Blunt-TOPO kloniert und sequenziert. Der entsprechende Klon enthält zwei stille Mutationen und wurde weiter verwendet.

4.11.19 Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression

Zur Proteinexpression in *E. coli* wurde die pQE3x-Vektorserie (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Vektoren erlauben die IPTG-induzierte Expression eines His-getaggtten Proteins. Das His-Tag ist im Vektor codiert und befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins, auf DNA-Ebene also vor der Multiple Cloning Site (MCS). Alle drei Vektoren sind identisch, nur die MCS ist relativ zum Translationsstart jeweils um ein Nukleotid verschoben um eine in-Frame Klonierung unabhängig vom Insert zu ermöglichen.

SPL7

Die, wie unter 4.11.18 beschrieben, klonierte *SPL7*-cDNA wurde mittels der enthaltenen *SmaI/SaII*-Schnittstellen in den ebenso geschnittenen Vektor pQE30 subkloniert. Da eine Expression des vollständigen Proteins nicht gelungen ist (nicht gezeigt), wurde eine verkürzte Variante, welche die DNA-Bindungsdomäne (SPL7-DBD) enthält, subkloniert. Diese Variante enthält die Aminosäuren 112-234 des SPL7-Proteins. Die SBP-Domäne wird durch die Positionen 137-215 definiert. Zur Klonierung wurde der entsprechende Teil der cDNA mittels der Primer SPL7_DBD_f und SPL7_DBD_r amplifiziert und mittels der im Amplifikat enthaltenen *BamHI/HindIII*-Schnittstellen in pQE31 kloniert. Das erhaltene Konstrukt codiert für eine verkürzte SPL7-Variante mit N-terminalem His-Tag und wurde durch Sequenzierung überprüft.

WRKY70

Die, wie unter 4.11.18 beschrieben, klonierte *WRKY70*-cDNA (enthält Start- und Stop-Codon) wurde mittels *BamHI/KpnI*-Spaltung aus pCR4Blunt-TOPO ausgeschnitten und in den ebenfalls *BamHI/KpnI* geschnittenen Vektor pQE32 kloniert und sequenziert. Das so erhaltene Konstrukt codiert für das vollständige WRKY70-Protein mit N-terminalem His-Tag.

4.11.20 T-DNA-Konstrukte zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren

Für die Expression der Transkriptionsfaktoren in Protoplasten bzw. für die Erstellung transgener Überexpressionspflanzen wurde der T-DNA-Vektor pORE-O2 (Coutu *et al.*, 2007) modifiziert.

Dazu wurde zunächst der doppelte 35S-Promotor aus p70S-LUC in die *HindIII/XhoI*-Schnittstellen von pORE-O2 kloniert. Der entstandene Vektor pORE-O2-d35S-pA wurde zudem noch weiter modifiziert, indem ein c-Myc-Tag in die *XhoI/XbaI*-Schnittstellen des Vektors kloniert wurde. Dafür wurden die Oligonukleotide c-myc_fwd und c-myc_rev annealt und in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert. Der so erhaltene Vektor pORE-O2-d35S-pA-cmyc ermöglicht die Expression von Proteinen mit N-terminalem c-Myc Tag.

WRKY70

Die, wie unter 4.11.18 beschrieben, klonierte *WRKY70*-cDNA wurde mittels der enthaltenen *BamHI/KpnI*-Schnittstellen aus pCR4Blunt-TOPO in den entsprechend geschnittenen pORE-O2-d35S-pA bzw. pORE-O2-d35S-pA-cmyc-Vektor kloniert.

SPL7

Zur Subklonierung von *SPL7* wurde das unter 4.11.18 beschriebene pCR4Blunt-TOPO-Konstrukt mit *SmaI/SaI* geschnitten und die cDNA in die ebenfalls *SmaI/SaI* geschnittenen pORE-O2-d35S-pA und pORE-O2-d35S-pA-cmyc-Vektoren ligiert.

JAG

Die JAG-cDNA wurde mittels der bei der Klonierung angefügten *BamHI/SaI*-Schnittstellen aus pCR4Blunt-TOPO (4.11.18) in pORE-O2-d35S-pA bzw. pORE-O2-d35S-pA-cmyc umklont.

4.11.21 Expression & Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden geeignete Konstrukte in der pQE-3x-Vektorserie (Qiagen, Hilden, Deutschland) erstellt (4.11.19) und mittels Hitzeschock-Transformation in den *E. coli*-Expressionsstamm M15 transformiert (4.11.10). Die Expressionsstämme wurden dann in einer 10 ml Vorkultur in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Morgen wurde eine Hauptkultur (200 ml) mit 1/60 Volumen der Vorkultur angeimpft und weiter bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Durch Zugabe von IPTG zur Endkonzentration von 1 mM wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Nach weiteren 4 h Inkubation unter Schütteln (37 °C) wurden die Zellen bei 4.000 g für 20 min zentrifugiert (4 °C). Das Zellpellet wurde bei -20 °C eingefroren oder direkt weiter bearbeitet. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde zunächst in 4 ml NPI-10 pro Gramm Zellpellet suspendiert, Benzoase® Nuclease (3 Units/ml Kulturvolumen; Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) und „Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA free (100x)“ (Endkonzentration 1x, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA) hinzu gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung für sechsmal 10 s (200 W) mit zwischenzeitlicher Kühlung der Probe auf Eis. Zur Klärung des Lysates wurde für 20-30 min bei 10.000 g zentrifugiert (4 °C) und der Überstand anschließend weiter bearbeitet.

Zur Aufreinigung von SPL7-DBD wurde das NiNTA Spin Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Säulen wurden einmal mit NPI-10 und zweimal mit NPI-20 gewaschen, bevor die Elution mit NPI-500 in zwei Schritten erfolgte.

Aufgrund längerer Kontaktzeiten mit der NiNTA-Matrix wurde zur Aufreinigung des His-getaggen rekombinanten WRKY70-Proteins „Chelating Sepharose Fast Flow“ (GE

Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Sepharose wurde zunächst mit Nickel-Ionen geladen. Dazu wurde 1 ml Sepharose-Suspension durch Zentrifugation (500 g, 30 s) in einem 50 ml Falcon pelletiert, 5 min in 5 ml dH₂O gewaschen, erneut zentrifugiert, das Pellet in 0,5 ml 0,1 M NiSO₄-Lösung suspendiert und 5 min im Überkopfschüttler inkubiert. Die mit Nickel-Ionen beladene Sepharose wurde erneut wie oben zentrifugiert und 5 min mit 5 ml dH₂O gewaschen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt, bevor die Sepharose in 1 ml NPI-10 suspendiert und mit dem geklärten Lysat (s.o.) gemischt wurde. Zur Bindung des His-getaggten Proteins an die Nickel-Sepharose wurde eine Stunde bei 4 °C inkubiert (Überkopfschüttler), anschließend zentrifugiert und das Pellet mit 5 ml NPI-40* gewaschen (5 min, Überkopfschüttler). Dieser Waschschrift wurde zweimal mit steigender Imidazol-Konzentration im Puffer durchgeführt (NPI-60*, NPI-80*). Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 1 ml NPI-500. Die Eluate wurden getrennt behandelt und mit Proben der übrigen Aufreinigungsschritte mittels einer SDS-PAGE (12 % Acrylamid) analysiert und ggf. dialysiert (4.11.22 und 4.11.23).

**Die hier angegebenen Waschlösungen beziehen sich auf die optimierte WRKY70-Aufreinigung. Bei Etablierung einer neuen Proteinaufreinigung werden die Waschschrift üblicherweise zunächst mit NPI-10, NPI-20 und NPI-30 durchgeführt.*

4.11.22 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für SDS-PAGE wurden Polyacrylamid-Gele verschiedener Konzentrationen wie folgt hergestellt: Das Trenngel wurde entsprechend der gewünschten Acrylamid-Konzentration aus den einzelnen Reagenzien gemischt. Beispielhaft ist ein Gemisch für ein 12 %-iges Gel gezeigt. Für andere Acrylamid-Konzentrationen wurde das Volumen der Acrylamid-Lösung (30 %) und des Wassers entsprechend angepasst.

Trenngel (12 %)

1,65 ml	dH ₂ O
2 ml	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Carl Roth)
1,25 ml	1,5 M TRIS, pH 8,8
0,05 ml	10 % (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,05 ml	10 % (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat)
0,002 ml	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2Bis-(dimethylamino)-ethan)

Nach Zugabe von APS und TEMED wurden 4,5 ml der Gelmischung zügig zwischen zwei Glasplatten (7,3 x 10,1 cm) für Minigele mit 1 mm Spacer gegossen. Das Gel wurde dann vorsichtig mit Isopropanol überschichtet und zum Polymerisieren inkubiert. Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde das Isopropanol entfernt, kurz mit dH₂O gespült, das Sammelgel (s.u.) angesetzt, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit zehn Taschen eingesteckt.

Sammelgel (6 %)

1,31 ml	dH ₂ O
0,4 ml	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Carl Roth)
0,25 ml	1,5 M TRIS, pH 8,8
0,02 ml	10 % (w/v) SDS
0,02 ml	10 % (w/v) APS
0,002 ml	TEMED

Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt, die Taschen ggf. mit Filterpapier gereinigt, mit Laufpuffer ausgespült und das Gel anschließend in die Elektrophorese-Apparatur (MiniProtean Tetra System, Bio-Rad, München, Deutschland) eingesetzt.

Zur Analyse von Proteinen, z.B. nach der Aufreinigung aus *E. coli*, wurden die zu untersuchenden Proben mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden danach auf Raumtemperatur abgekühlt und neben einem geeigneten Marker (z.B. PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA) auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel geladen und bei 150 V solange in TRIS-Glycin-Puffer elektrophoretisiert bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Das Gel wurde dann aus der Elektrophorese-Apparatur entfernt, aus den Glasplatten gelöst und, wie unter 4.11.25 angegeben, angefärbt oder für einen Western Blot verwendet (4.11.24).

4.11.23 Dialyse

Wie unter 4.11.21 aufgereinigte Proteine wurden vor der weiteren Verwendung für Gelshift-Experimente dialysiert. Dazu wurde typischerweise 1 ml der Probe in einer Dialysekapsel (z.B. Float-A-Lyzer G2, Spectrum Laboratories, Brada, Niederlande) mit einer Ausschlussgrenze von 3,5-5 kDa dialysiert. Die Membran wurde zuvor gemäß Herstellerangaben vorbereitet. Die Dialyse gegen 2 l 1x Gelshift-Bindungspuffer erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren. Die so in 1x Gelshift-Bindungspuffer umgepufferten Proteine

wurden in kleinen Aliquots (ca. 100 µl) bei -20 °C gelagert und für Gelshift-Experimente verwendet (4.11.27).

4.11.24 Western Blot

Zum Nachweis His-getaggtter Proteine mittels Anti-His-Antikörper wurden zwei identische Proteingele, wie unter 4.11.22 beschrieben, angefertigt und die zu untersuchenden Proben aufgetrennt. Eines der Gele wurde nach der Elektrophorese mittels Coomassie-Färbung angefärbt (4.11.25), um später als Vergleich zu dienen. Das zweite Gel wurde wie folgt geblotet:

Zunächst wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel anschließend für 15 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Parallel wurde PVDF-Transferrmembran (Millipore Immobilon P, Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Aktivierung für 15 s in Methanol geschwenkt, anschließend 2 min in Wasser getaucht und für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Blotting-Vorgang wurde die „Mini Trans-Blot Cell“ (BioRad, München, Deutschland) benutzt. Dazu wurde in die Blotting-Kassette zunächst ein mit Transfer-Puffer getränkter Schwamm gelegt, gefolgt von ebenfalls in Puffer getränktem 3 M Whatman-Papier und dem Gel. Auf das Gel wurde dann die äquilibrierte Membran gelegt, gefolgt von einer weiteren Lage Whatman-Papier und einem weiteren Schwamm. Die Kassette wurde verschlossen, in das Elektrodenmodul eingesetzt und in eine mit vorgekühltem Transfer-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 30 V und 4 °C.

Anschließend wurde der Blot abgebaut und die Membran entnommen. Diese wurde für mindestens 30 min in 10 ml Blocking-Puffer geschwenkt, bevor 10 µl des Primären Antikörpers (Anti-His-pAB, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzu gegeben wurden. Die Hybridisierung erfolgte unter leichtem Schwenken für 60 min. Die Hybridisierungslösung wurde entfernt, zum Waschen durch 1x PBST ersetzt und die Membran darin für 15 min geschwenkt. Der Puffer wurde dann abgeschüttet und der Waschschrift zweimal wiederholt. Die Hybridisierung mit dem sekundären Antikörper erfolgte anschließend in 10 ml Blocking-Puffer mit 3,3 µl Anti-Rabbit HRP Antikörper (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) für weitere 60 min. Danach wurde die Membran noch 3-4 Mal in 1x PBST gewaschen (je 15 min).

Zur Entwicklung der Chemilumineszenz-Reaktion wurden je 1 ml Entwicklerlösung 1 und 2 gemischt und auf der Membran verteilt. Diese wurde für 5 min inkubiert, bevor die Entwicklerlösung entfernt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen wurde. In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und für 5-10 min exponiert. An-

schließlich wurde der Röntgenfilm entwickelt und anhand der vorgefärbten Markerbanden auf der Membran bzw. anhand des Coomassie-gefärbten Referenzgels die Größe und Identität der einzelnen Signale ermittelt.

4.11.25 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Für die Coomassie-Färbung wurde das Sammelgel eines wie unter 4.11.22 angefertigten Proteingels entfernt, das Trenngel in ca. 30 ml dH₂O überführt und kurz in der Mikrowelle erhitzt (das Wasser darf nicht siedend). Es wurde für 3-5 min geschwenkt, das Wasser ausgetauscht und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung überschichtet, nochmals in der Mikrowelle erhitzt und zum Färben der Proteinbanden geschwenkt (ca. 20 min). Anschließend wurde das Gel erneut in dH₂O überführt und fotografisch dokumentiert.

4.11.26 Erstellung Biotin-markierter DNA-Moleküle

Biotin-markierte Oligonukleotide wurden mit dem „Biotin 3' End DNA Labeling Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) erstellt. Dazu wurden die zu markierenden einzelsträngigen Oligonukleotide zu einer Konzentration von 1 µM gelöst und entsprechend dem Herstellerprotokoll in die Markierungsreaktion eingesetzt. Die entstandenen markierten Einzelstränge wurden mittels Annealing mit dem revers komplementären Gegenstrang zu doppelsträngigen Oligonukleotiden weiter verarbeitet (4.11.2).

4.11.27 Gelshift-Assay

Zur *in vitro* Analyse von Protein-DNA-Interaktionen wurden Gelshift-Experimente durchgeführt. Dazu wurde das „LightShift Chemiluminescent EMSA Kit“ (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) verwendet. Die dafür benötigten Biotin-markierten Oligonukleotide wurden, wie unter 4.11.26 beschrieben, mit der entsprechenden Markierung versehen. Anschließend wurden die für den Gelshift benötigten doppelsträngigen Moleküle durch Annealing erzeugt (4.11.2). Die Gelshift-Experimente wurden mit kleinen Modifikationen gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt:

Das für das Experiment benötigte 6% Acrylamidgel wurde nach folgendem Rezept angesetzt und in den zur „Mini Protean Tetra Cell“ (Bio Rad, München, Deutschland) gehörigen Glasplatten für Mini-Gele (7,3 x 10,1 cm, 1 mm Spacer) gegossen und ausgehärtet:

5,55 ml	dH ₂ O
1,25 ml	Rotiphorese® Gel 40 (29:1, Carl Roth)
0,75 ml	5x TBE
75 µl	10 % (w/v) APS
4,5 µl	TEMED

Vor der Beladung mit den Proben wurden die Taschen mit 0,5x TBE gespült und das Gel 30-60 min bei 100 V in 0,5x TBE vor-elektrophoretisiert.

Für die Bindungsreaktion wurde aufgereinigtes, rekombinantes Protein in 1x Gel-shift-Bindungspuffer (4.11.21 und 4.11.23) verwendet. Für eine typische Bindungsreaktion in 20 µl Volumen wurden die Komponenten in der unten angegebenen Reihenfolge zusammengegeben und vorsichtig gemischt:

ddH ₂ O	für 20 µl Endvolumen
10x Gelshift-Bindungspuffer	für 1x Endkonzentration
Poly(dI-dC) [1µg/µl]*	1 µl
Unmarkierte Kompetitor-DNA [2-10 µM]	1 µl (<i>abhängig vom Experiment</i>)
Rekombinantes Protein (in 1x Bindungspuffer)	0,1-0,5 µg
Biotin-markierte DNA [0,01 µM]	2 µl

* aus *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Fisher Scientific, IL, USA)*

Bei Verwendung von Kompetitor-DNA wurde vor der Zugabe der Biotin-markierten DNA eine 10-minütige Vorinkubation (23 °C) durchgeführt. Nach Zugabe der markierten Sonde wurde für 25 min inkubiert (23 °C), anschließend 5 µl 5x EMSA-Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) zugegeben, vorsichtig gemischt, die Proben auf das 6% Polyacrylamidgel geladen und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Sobald die Bromphenolblau-Bande das Gel zu ca. 2/3 der Länge durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Das anschließende Blotten des Gels auf Biotinylated Nylon-Membran (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) erfolgte mit der „Mini Trans-Blot Cell“ (BioRad, München, Deutschland) entsprechend der Anweisungen im Kit. Das Fixieren der Membran wurde anschließend am „Stratalinker UV-Crosslinker“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) mit der Auto-Crosslink Funktion durchgeführt. Die anschließende Detektion der Biotin-gelabelten DNA wurde ebenfalls nach dem Kit-Protokoll durchgeführt. Die Expositionszeit für den Röntgenfilm lag typischerweise bei 1-10 min, bevor dieser entwickelt wurde.

4.11.28 Transformation von Hefe-Zellen

Die Transformation von Hefe-Zellen wurde in modifizierter Form nach Gietz & Schiestl (Gietz und Schiestl, 2007) durchgeführt. Dazu wurde der zu transformierende Hefe-Stamm (z.B. Y1HGold) auf YPAD-Medium bzw. geeignetem SD Drop-Out-Medium ausgestrichen und 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. 5 ml YPAD-Medium (bzw. SD Drop-Out-Medium) wurden dann mit einer einzelnen, großen Kolonie angeimpft und über Nacht (12-16 h) bei 30 °C geschüttelt (150-200 rpm). Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Thomakammer bestimmt. $2,5 \times 10^8$ Zellen wurden zu 50 ml vorgewärmten 2xYPAD-Medium gegeben und unter Schütteln inkubiert (150-200 rpm, 30°C) bis die Zelldichte bei 2×10^7 /ml lag (4-5 h). Um bestes Wachstum zu gewährleisten, darf dieser Schritt nicht mit Drop-Out-Medium durchgeführt werden. Die Zellen wurden bei 3.000 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 25 ml sterilem dH₂O gründlich resuspendiert, bevor erneut zentrifugiert wurde. Der Waschschrift wurde mit 25 ml dH₂O wiederholt und das Pellet anschließend in 1 ml dH₂O suspendiert. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, für 30 s bei 13.000 g zentrifugiert und die Zellen in 1 ml dH₂O suspendiert. Für jede geplante Transformation wurden 100 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, nochmals für 30 s bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Zu dem Zellpellet wurden folgende Lösungen in der aufgeführten Reihenfolge zugegeben:

240 µl	50% PEG 3350
36 µl	1 M Lithiumacetat
50 µl	Carrier-DNA (denaturiert)
34 µl	Plasmid-DNA (0,1-1 µg) plus H ₂ O *

Gesamtvolumen 360 µl

**Bei Verwendung integrativer Plasmide, wie z.B. pAbAi, wurde das Plasmid zuvor linearisiert, um die homologe Rekombination mit dem Integrationsort zu ermöglichen*

Die Zellen wurden durch sehr gründliches Mischen mit dem Vortex-Mixer in dem Transformationsansatz resuspendiert und sofort für 40 min in einem 42 °C Wasserbad inkubiert. Dabei wurde gelegentlich durch Invertieren gemischt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen abzentrifugiert (30 s, 13.000 g) und entweder direkt in 1 ml dH₂O suspendiert und ausplattiert oder für erhöhte Ausbeute in 1 ml 2xYPAD aufgenommen und 90 min bei 30 °C inkubiert. Nach diesem optionalen Schritt wurde wieder zentrifugiert (30 s, 13.000 g), in 1 ml dH₂O

suspendiert und 20-200 µl auf geeignetem Selektionsmedium plattiert. Die Selektionsplatten wurden für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert und die Transformanten im Anschluss analysiert.

4.11.29 Plasmidpräparation aus Hefe-Zellen

Zur Isolation von Plasmiden aus rekombinanten Hefe-Zellen wurden 5 ml Vorkulturen in geeignetem Selektionsmedium über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen pelletiert (15.000 g, 30 s), in 100 µl Resuspendierungslösung suspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl Denaturierungslösung zugegeben, gemischt und 5 min auf Eis inkubiert, bevor 150 µl Neutralisierungslösung zugegeben und weitere 5 min auf Eis inkubiert wurde. Durch Zentrifugation für 5 min bei 15.000 g wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und mit zwei Volumen Ethanol gefällt. Nach 5 min Inkubation wurde die DNA durch Zentrifugation bei 15.000 g für 10 min pelletiert, das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 15.000 g) und nach dem Trocknen in 20 µl dH₂O gelöst. 1 µl der DNA-Lösung wurde dann zur Retransformation und weiteren Analyse in *E. coli* verwendet (4.11.9).

4.11.30 Yeast One-Hybrid-Screening

Yeast One-Hybrid-Screenings wurden durchgeführt, um potentiell mit *cis*-Sequenzen interagierende Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* zu identifizieren. Dazu wurde ein Bait-Stamm, welcher ein Reportergenkonstrukt unter der Kontrolle der zu untersuchenden *cis*-Sequenz enthielt, mit einer cDNA-Bank transformiert. Die dazu verwendete cDNA-Bank enthält ca. 1.500 *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktoren als Gal4AD-Fusionen im pDEST_GAD424-Vektor (Prey-Vektor, Mitsuda *et al.*, 2010).

Erstellung und Analyse des Bait-Stammes

Zur Erstellung des Bait-Stammes für ein Screening wurde das gewünschte Bait-Konstrukt (vgl. 4.11.17), wie unter 4.11.28 beschrieben, in Hefe transformiert. Dabei kam der Hefe-Stamm Y1HGold (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) zum Einsatz. Transformanten wurden auf Hintergrundaktivierung des Reportergens untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zellen auf passendem Selektionsmedium, in dem zusätzlich Histidin fehlte (SD-Trp/-His), analysiert. Eine eventuelle Hintergrundaktivität des Reportergens wurde durch Zugabe von 50 oder 100 mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) inhibiert. Für diese Analyse wurde eine Kolonie in 1 ml sterilem dH₂O suspendiert und verschiedene Verdünnungen (üblicherweise 1:100, 1:1.000, 1:10.000) angesetzt. Von diesen Verdünnungen wurden je 10 µl auf Selektionsmedium mit 0, 50 und 100 mM 3-AT getropft, der Tropfen an der Luft

getrocknet (ohne zu plattieren) und dann 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Durch einen Vergleich des Wachstums auf den verschiedenen Platten wurde die 3-AT-Konzentration gewählt, die ausreichend für eine Inhibierung der Hintergrundaktivität war. Diese InhibitorKonzentration wurde auch für das Screening verwendet.

Amplifikation der cDNA-Bank

Zur Amplifikation der TF-only Bank in *E. coli* wurde mittels Elektroporation in mehreren Ansätzen Library-DNA in XL1 Blue MRF'-Zellen transformiert und die Ansätze anschließend vereinigt. Der Titer dieser Primärtransformation wurde auf ca. $6,6 \times 10^6$ Klone/ml bestimmt. Von diesem Transformationsansatz wurden ca. $1,5 \times 10^6$ Klone auf Selektionsmedium plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden mittels LB-Medium von den Platten gespült und die Zellsuspension vereinigt. Durch Zentrifugation bei 6.000 g für 15 min (4 °C) wurden die Zellen pelletiert. Aus diesen Zellen wurde anschließend, wie unter 4.11.11 beschrieben, mittels Plasmid-Midi-Präparation die Plasmid-DNA isoliert.

Screening der cDNA-Bank

Zum Screening der cDNA-Bank (s.o.) wurde der zu untersuchende Bait-Stamm, wie unter 4.11.28 beschrieben, mit Plasmid-DNA der Bank transformiert. Für ein Screening wurden 20 einzelne Transformationen mit jeweils 500 ng DNA angesetzt. Die einzelnen Ansätze wurden nach dem Hitzeschock entsprechend Abschnitt 4.11.28 pelletiert, in je 1 ml 2xYPAD suspendiert, vereinigt und 90 min bei 30 °C geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 3.000 g) wurden die Zellen in 25 ml dH₂O suspendiert. Zur Bestimmung der Anzahl an Transformanten bzw. der Transformationseffizienz wurden je 10 bzw. 20 µl der Suspension auf Selektionsmedium plattiert, welches nur auf die Anwesenheit von Prey- und Bait-Plasmid jedoch nicht auf Expression des Reporters (*HIS3*) selektiert (SD -Leu/-Trp). Die restlichen Zellen wurden zu je 500 µl auf große Petrischalen (150 mm Durchmesser) mit Selektionsmedium (mit der geeigneten 3-AT-Konzentration), welches auf die Plasmide und auf Reporter-genaktivität selektiert (SD -Leu/-Trp/-His + 3-AT), ausplattiert.

Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert (3-6 Tage). Dabei wurde regelmäßig das Koloniewachstum kontrolliert. Bei sehr hohen Koloniezahlen wurden die am schnellsten wachsenden Klone identifiziert und für weitere Analysen benutzt. Ansonsten wurden alle Klone weiter untersucht. Vor weiteren Analysen wurden potentiell positive Klone ausgewählt und auf frisches Selektionsmedium überimpft. Diese Masterplatten wurden zweimal einer Replikaplattierung unterzogen, um das Wachstum auf dem Selektionsmedium zu bestätigen. Durch diese wiederholte Selektion wurden außerdem die eventuell in den positiven Klonen vorhandenen zusätzlichen Prey-Plasmide entfernt.

Für weitere Analysen wurden die positiven Klone entweder in eine Hefe-Kolonie-PCR (4.11.3) eingesetzt oder die Plasmide direkt isoliert (4.11.29), in *E. coli* transformiert und sequenziert (4.11.9 und 4.11.13). Wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, so wurde anhand der auftretenden Amplifikate eine Auswahl getroffen und diese PCR-Produkte direkt sequenziert. Für die Kolonie-PCR wurden die Primer Gal4AD und Gal4AD-RV eingesetzt. Für die anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte bzw. der Plasmide wurde der Primer Gal4AD verwendet.

4.11.31 Kultivierung der Petersilie-Zellkultur

Die Petersilie-Zellkultur wurde bei 23 °C, 160 rpm und Dunkelheit in 40 ml HA-Medium kultiviert. Alle sieben Tage wurden ca. 3-3,5 g Zellen mit einem Metallsieb in frisches HA-Medium überführt. Zur Isolierung von Protoplasten wurden 5 Tage alte Kulturen, wie unter 4.11.32 beschrieben, bearbeitet.

4.11.32 Isolation und Transfektion von Petersilie-Protoplasten

Die Isolierung und anschließende Transfektion von Petersilie-Protoplasten wurde, wie bei Koschmann (Koschmann *et al.*, 2012) beschrieben, durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten im Ausschwingrotor einer Beckman GS-6KR-Zentrifuge.

Eine gemäß Abschnitt 4.11.31 kultivierte, fünf Tage alte Kultur wurde für die Protoplastierung zunächst bei Raumtemperatur zentrifugiert (300 g, 5 min), das Zellpellet in 30 ml Enzymlösung suspendiert, mit CaCl₂-Lösung auf 90 ml aufgefüllt und auf zwei große Petrischalen (150 mm Durchmesser) aufgeteilt. Die Suspension wurde für 20 h bei ca. 20 rpm und anschließend nochmals für 20 min bei 40-45 rpm in Dunkelheit inkubiert (23 °C). Die Suspension wurde danach in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (300 g, 2 min, RT), die Pellets in je 30 ml CaCl₂-Lösung gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und anschließend in je 25 ml P5-Medium aufgenommen. Die Proben wurden vereinigt, zentrifugiert (300 g, 5 min, RT) und die an der Oberfläche als Ring flottierenden Protoplasten anschließend mit einer Transferpipette in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Nach Auffüllen und Resuspendieren in P5-Medium wurde die Zentrifugation wiederholt, die flottierenden Protoplasten abgenommen, auf zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und nach erneutem Auffüllen nochmals wie zuvor zentrifugiert. Die flottierenden Protoplasten wurden in möglichst kleinem Volumen abgenommen, vereinigt und sofort für die Transfektion verwendet.

Dazu wurden 20 µl Plasmid-DNA ($c=0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 200 µl PEG-Lösung gemischt. Bei Experimenten zur Untersuchung der Induzierbarkeit durch Pep25 wurde das jeweilige Reporterplasmid (pBT10GUS-d35SLUC-Konstrukt) verwendet. Für Kotransfektionsexperimente wurden der Expressionsvektor (pORE-d35S-pA-Konstrukt) und das Reporterplasmid im Verhältnis 3:1 gemischt (15 µl Expressionsvektor + 5 µl Reporterplasmid, beide $c=0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Die Transfektion wurde durch Zugabe von 200 µl Protoplastensuspension und gründliches Mischen gestartet. Der Ansatz wurde 20 min dunkel inkubiert (RT), bevor die Transfektion durch langsame Zugabe von 5 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -MES-Lösung gestoppt wurde. Es folgte eine Zentrifugation (150 g, 7 min), der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 6 ml P5-Medium resuspendiert. Danach wurde jeder Transfektionsansatz zu gleichen Teilen auf zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Sollte die Induzierbarkeit einer Sequenz durch Pep25 untersucht werden, wurde zu einem der Röhrchen Pep25-Lösung (Endkonzentration 300 ng/ml) hinzu gegeben. Bei Kotransfektionsexperimenten ohne Pep25-Zugabe wurden die beiden Röhrchen als technische Replikate behandelt.

Die weitere Inkubation der Protoplasten erfolgte bei ca. 23 °C für 24 h (dunkel, Röhrchen liegend). Im Anschluss wurde jeder Ansatz mit 9 ml CaCl_2 -Lösung aufgefüllt, gemischt und zentrifugiert (1.400 g, 10 min). Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Pellets in flüssigem N_2 gefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der LUC- bzw. GUS-Aktivität wurden die gefrorenen Pellets mit jeweils 150 µl LUC-Extraktionspuffer versetzt, gevortext, für 20 min bei 4 °C geschüttelt (Mixer 5432, Eppendorf) und das Extrakt durch Zentrifugation (25.000 g, 20 min, 4 °C) geklärt. Die Überstände wurden dann zur Proteinbestimmung (4.11.37) verwendet. Anhand der gemessenen Werte wurden die Proben in LUC-Extraktionspuffer auf 80 µg/ml Gesamtprotein verdünnt und so zur Messung von LUC- und GUS-Aktivität verwendet (4.11.38 bzw. 4.11.40).

4.11.33 Kultivierung von *A. thaliana* in Steril- bzw. Erdkultur

Zur Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen in Sterilkultur wurden bis zu 1.000 Samen (ca. 20 mg) zunächst einer Sterilisation unterzogen. Dazu wurden die Samen für 2 min in 70 % Ethanol geschüttelt, die Flüssigkeit entfernt, durch 1 ml Sterilisierlösung ersetzt und weitere 8 min unter Schütteln inkubiert. Die Samen wurden anschließend viermal je 1 min in sterilem Leitungswasser gewaschen, bevor sie in 0,1 % steriler Agaroselösung aufgenommen wurden. Je nach Anwendung wurde mittels einer Pipette die gewünschte Menge Samen auf ½ MS-Nährmedium (ggf. mit Kanamycin bzw. PPT) ausgebracht, unter der Cleanbench offen inkubiert, bis die überschüssige Agaroselösung eingetrocknet war und die Platten mit

Leukopor (BSN medical, Hamburg, Deutschland) verschlossen. Zur Stratifikation wurden die Platten für 48 h bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Die anschließende Inkubation erfolgte bei ca. 24 °C unter Kurztag- (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) oder Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) in einem Lichtschrank (CU-32L und CU-36L/4, Percival Scientific, Perry, IA, USA).

Die Kultivierung von *Arabidopsis* in Erdkultur erfolgte in einem Gemisch aus Pflanz- und Blumenerde (1:1 Gemisch, Compo Sana, Münster, Deutschland). *Arabidopsis*-Samen wurden ohne vorherige Sterilisation auf stark gewässerte Erde ausgebracht, wie oben beschrieben zur Stratifikation inkubiert (4 °C, Dunkelheit) und in einer Klimakammer kultiviert (Langtag- bzw. Kurztagbedingungen, s.o.). Die Pflanzen wurden regelmäßig gewässert, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Staunässe entstand, sondern die Erde zwischenzeitlich fast ganz austrocknete.

Zur Vermehrung wurde die betreffende Pflanze unter Langtagbedingungen inkubiert, bis sich der Blütenspross bildete. Mittels des ARACON-Systems (BETATECH, Gent, Belgien) wurde der Blütenspross abgedeckt und die Pflanze solange weiter inkubiert und gewässert bis die ersten reifen Samenschoten gebildet wurden. Danach wurde die Pflanze nicht weiter gewässert, bis der gesamte Samenstand getrocknet war. Zur Ernte der Samen wurde der gesamte Samenstand in eine Papiertüte überführt, diese zwischen den Händen gerieben, so dass sich die Samen aus den Schoten lösten und diese dann mittels eines Metallsiebes vom übrigen Pflanzenmaterial getrennt. Die erhaltenen Samen wurden bei Raumtemperatur trocken gelagert.

4.11.34 Isolation und Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten

Die Isolation von Protoplasten aus *A. thaliana*-Blättern wurde mit kleineren Modifikationen nach Wu et al. (2009a) durchgeführt. Die verwendeten Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (16h Licht, 8h Dunkelheit) bei ca. 23°C in Erde angezogen. Für die Protoplastenisolation wurden ausgewachsene Blätter von 4-5 Wochen alten Pflanzen genutzt, welche noch keinen Blütenspross ausbildeten.

Ca. 10-15 Blätter wurden mit einer Rasierklinge abgetrennt und mit der oberen Epidermis auf einem Stück Time Tape (Precision Dynamics Corp., Valancia, Kalifornien) fixiert. Auf die untere Epidermis wurde mit vorsichtigem Druck ein Stück Scotch® Magic™ Tape (3M France, Cergy Pontoise Cedex, Frankreich) geklebt. Durch langsames Auseinanderziehen der beiden Klebestreifen wurde die untere Epidermis abgetrennt, während das restliche Blatt auf

dem Time Tape verblieb. Die Klebestreifen mit den freigelegten Mesophyll-Zellen wurden sofort mit der Blattseite nach unten in 15 ml Enzymlösung gelegt. Es folgte eine Inkubation bei leichtem Schwenken (ca. 30 rpm) und ca. 23 °C in Dunkelheit, bis die Protoplasten freigesetzt waren. Dies dauert in der Regel 1,5-2 h.

Um im weiteren Verlauf die Adhäsion der Protoplasten an Plastikoberflächen zu vermindern, wurden in der Zwischenzeit alle Plastikgefäße, einschließlich der Zellkultur-Platten, für einige Sekunden mit 1 % BSA-Lösung behandelt.

Die Protoplasten-Suspension wurde durch ein Nylon-Siebgewebe mit 60 µm Maschenweite gefiltert und mit ca. 10 ml W5-Lösung nachgespült. Es folgte eine Zentrifugation in einem 50 ml Rundboden-Röhrchen (100 g, 2 min), Abnehmen des Überstandes und zweimaliges Waschen des Pellets in je 25 ml W5 (100 g, 2 min). Alle Zentrifugationsschritte, einschließlich aller folgenden, erfolgten im Ausschwingrotor einer GS-6KR Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). Das Pellet wurde in 1 ml W5 aufgenommen, die Dichte der Protoplasten (PP) mittels einer Thomakammer bestimmt und auf 2×10^5 PP/ml in W5 eingestellt. Diese Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit hatten sich die Protoplasten abgesetzt, sodass der Überstand entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur in MMg-Lösung zu 2×10^5 PP/ml gelöst werden konnte.

Die Transfektion wurde mit kleineren Änderungen nach Yoo *et al.* (2007) durchgeführt. Dazu wurden 100 µl Protoplasten (2×10^4 PP) mit 15 µg DNA ($c = 1,5$ µg/µl) in einem 2 ml Eppendorfgefäß gemischt. Dabei wurde in der Regel ein DNA-Mix verwendet, der aus Effektorplasmid (z.B. Transkriptionsfaktor in pORE-O2-d35S-pA), Reporterplasmid (z.B. 30I-8_M1S1-pBT10GUS) und Transfektionskontrolle (pRT101-LUC) im Verhältnis 2:1:1 (5 µl Effektor, 2,5 µl Reporter und 2,5 µl pRT101-LUC, alle $c=1,5$ µg/µl) bestand. Es folgte die Zugabe von einem Volumen (110 µl) PEG-Lösung, vorsichtiges aber gründliches Mischen und eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Durch langsames Auffüllen mit W5 wurde die Transfektion beendet, die Protoplasten bei 100 g abzentrifugiert (1 min, Beckman GS-6KR Zentrifuge) und das Pellet zweimal in 2 ml W5 gewaschen (100 g, 1 min). Das Pellet wurde dann in 1 ml B5-Medium aufgenommen und in ein Well einer 6-Well Zellkultur Platte überführt. Die beschriebene Transfektion konnte mit bis zu 20 Ansätzen gleichzeitig durchgeführt werden. Wurden mehr als 20 Ansätze benötigt, mussten die Ansätze nacheinander bearbeitet werden. Innerhalb eines Experimentes wurden pro Transfektionsansatz im Regelfall zwei bis drei technische Replikate bearbeitet.

Nach 16 h Inkubation bei ca. 23°C in Dunkelheit wurden die Protoplasten in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, mit 1 ml W5 aufgefüllt, gemischt und durch 2 min Zentrifugation bei 200 g pelletiert (Beckman GS-6KR). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Hatte sich nach der Zentrifugation noch kein klar definiertes Pellet gebildet, wurde der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen, erneut mit W5 aufgefüllt und zentrifugiert.

Zur Bestimmung der GUS- und LUC-Aktivität wurden die gefrorenen Pellets jeweils mit 150 µl 1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Mannheim, Deutschland) versetzt, 5 s gevortext, für 5 min auf Eis inkubiert und dann 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (13.000 rpm, Heraeus Biofuge Pico). Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und bis zur Messung der LUC- (4.11.38) bzw. GUS-Aktivität (4.11.40) auf Eis gelagert.

4.11.35 Transformation und Selektion von *A. thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* mit T-DNA-Konstrukten erfolgte mittels der Floral Dip-Methode. Das Protokoll wurde mit einigen Modifikationen von Clough und Bent (Clough und Bent, 1998) übernommen. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in ca. 6x6 cm großen Töpfen in Erde ausgesät (ca. vier Pflanzen pro Topf) und unter Langtagbedingungen inkubiert (4.11.33). Die ersten Blütenstände wurden abgeschnitten, um die vermehrte Bildung von Blütenständen zu stimulieren. Pflanzen, bei denen sich Blütenstände mit möglichst vielen ungeöffneten Blüten gebildet haben, sind am besten geeignet und wurden für die unten stehende Prozedur genutzt.

A. tumefaciens-Zellen, welche das zu transformierende Konstrukt trugen, wurden zunächst in einer 5 ml Vorkultur (LB-Medium mit Antibiotika) angezogen (24 h, 25 °C). Mit 500 µl der Vorkultur wurde eine Großkultur im gleichen Medium angeimpft (400 ml) und für 18-24 h bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4.000 g, 30 min, RT) pelletiert und in Inokulationsmedium zu einer OD₆₀₀ von 0,8 resuspendiert. Die Blütenstände der zu transformierenden Pflanzen wurden für 2-3 s unter leichtem Schwenken in die Zellsuspension getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen für 24-48 h unter einer durchsichtigen Plastikabdeckung weiter kultiviert, um eine hohe Luftfeuchte zu ermöglichen. Danach wurde die Abdeckung entfernt und die Pflanzen unter Langtagbedingung weiter kultiviert, bis die Samen geerntet werden konnten. Diese wurden sterilisiert und auf ½ MS-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum bzw. Herbizid selektiert (4.11.33). Re-

sistente Pflanzen wurden in Erde umgesetzt, zur Blüte gebracht und die Nachkommenschaft weiter analysiert.

4.11.36 Pathogeninfektion von *A. thaliana*

Zur Analyse der Induzierbarkeit synthetischer Promotoren durch Pathogeninfektion wurden transgene *Arabidopsis*-Pflanzen, welche ein Promotor-GUS-Konstrukt tragen, mit verschiedenen Pathogenen infiziert und die Reporter-gen-Aktivität mit nicht infizierten Pflanzen verglichen. Die für die Infektionsexperimente verwendeten Pflanzen wurden auf ½ MS-Medium mit dem entsprechenden Herbizid unter Kurztagbedingungen angezogen (4.11.33) und zwei Wochen nach der Keimung in Erde transferiert. Die weitere Kultivierung erfolgte ebenfalls unter Kurztagbedingungen. Die unten beschriebenen Infektionsexperimente wurden an voll ausgebildeten Blättern von 5-8 Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000**

Zur Infektion von *Arabidopsis*-Pflanzen kamen zwei Stämme des hemibiotrophen phytopathogenen Bakteriums *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) zum Einsatz (4.6). Einer der beiden Stämme (*Pto* DC3000 *avrRPM1*) trägt das Avirulenzgen *avrRPM1*, welches in *A. thaliana* Col-0 zu einer inkompatiblen Reaktion führt. Der andere Stamm trägt dieses Gen nicht und kann die Pflanze erfolgreich infizieren. Zur Vorbereitung der Infektion wurde der entsprechende Stamm auf KB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin (50 mg/L) und Rifampicin (50 mg/L) ausgestrichen, 2 Tage bei 25 °C inkubiert und mit einer Einzelkolonie eine 5 ml ü.N. Kultur in KB-Medium (mit Antibiotika) angeimpft. Vorgewärmtes frisches Medium (50-100 ml) wurde mit 1/50 Volumen aus der Vorkultur angeimpft und für weitere 5-6 h unter Schütteln inkubiert (25 °C). Die deutlich bewachsene Kultur wurde durch Zentrifugation bei 3.000 g (10 min, RT) pelletiert und die Zellen zu einer OD₆₀₀ von 0,2 in sterilem dH₂O resuspendiert. Diese Suspension wurde 1:10 weiter verdünnt und wie folgt für die Infektion von *Arabidopsis*-Blättern verwendet.

Die Suspension wurde in eine nadellose 1 ml Spritze aufgezogen, diese auf die abaxiale Seite des Blattes aufgesetzt, mit einem Finger leichter Gegendruck ausgeübt und die Flüssigkeit in das Blattgewebe infiltriert. Dabei wurde die Mittelrippe möglichst vermieden und ein Bereich von ca. 4-5 mm Durchmesser infiltriert. Dieser Vorgang wurde am selben Blatt bis zu viermal an gleichmäßig über das Blatt verteilten Stellen wiederholt. Mit sterilem dH₂O infiltrierte Blätter an derselben Pflanze dienten als Kontrollen. Für die meisten Experimente wurden zwei Individuen einer Linie infiziert.

Nach der Infiltration wurden die Pflanzen mit Klarsichtfolie abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchte zu erzeugen. Die weitere Inkubation erfolgte wie zuvor unter Kurztagbedingungen. Zwei Tage nach Infektion (2 dpi) wurden die Blätter für qualitative und/oder quantitative GUS-Assays geerntet (4.11.39, 4.11.40).

***Botrytis cinerea* B05.10**

Neben den o.g. *Pseudomonas*-Stämmen kam auch der nekrotrophe Pilz *B. cinerea* B05.10 (4.6) für Infektionsexperimente an *Arabidopsis*-Pflanzen zum Einsatz. Dieser wurde zunächst auf „Kartoffelextrakt-Glucose-Agar“ (PDA-Medium, Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) angezogen (25 °C). Die Infektion erfolgte mit Modifikationen nach Mengiste *et al.* (Mengiste *et al.*, 2003). Hierzu wurden Sporen einer zehn Tage alten Kultur geerntet. Zur Sporenernte wurde ca. 10-15 ml Sabouraud Maltose Broth (SMB) auf die entsprechende Petrischale gegossen und mit vorsichtigem Druck mittels einer flach angelegten Glaspipette über das Myzel gestrichen. Dabei wurden die Sporen freigesetzt. Die so erhaltene Suspension wurde durch zwei Lagen Mullkompressen gefiltert und mittels einer Thomakammer die Sporendichte bestimmt. Für die Infektion wurde die Suspension auf 1×10^5 Sporen/ml in SMB eingestellt. 10 µl der Suspension wurden auf das zu infizierende Blatt getropft. Dabei wurde die Mittelrippe vermieden. Um ein frühzeitiges Eintrocknen des Tropfens zu verhindern, wurden die so behandelten Pflanzen in ein verschlossenes Gefäß mit Klarsichtdeckel gestellt. Um eine sehr hohe Luftfeuchte zu garantieren, wurden zusätzlich Bechergläser mit heißem Wasser zu den Pflanzen gestellt. Die weitere Inkubation erfolgte in diesen Gefäßen für drei Tage bei Kurztagbedingungen. Nach drei Tagen wurden die Blätter geerntet und für qualitative oder quantitative GUS-Assays eingesetzt (4.11.39, 4.11.40).

4.11.37 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Die zu vermessenden Proben wurden in der Regel 1:10 bis 1:50 in ddH₂O verdünnt (je nach zu erwartender Proteinkonzentration) und je 50 µl dieser Verdünnungen in eine durchsichtige 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei wurde jede Probe dreimal vorgelegt. Als Blindprobe wurde der Probenpuffer in der entsprechenden Verdünnung vorgelegt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Bradford-Arbeitslösung pro Probe, Inkubation für 5 min (RT) und anschließende sofortige Vermessung der Absorption bei 590 nm (Berthold TriStar LB 941, 0,1 s pro Well, Lampenenergie 13.000). Die gemessenen Werte wurden automatisch um den Blindwert (Blank) korrigiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration anhand der gemessenen Absorption wurden Standardreihen für jeden verwendeten Probenpuffer erstellt. Dazu wurden BSA-Lösungen in Konzentrationen von 10-100 µg/ml erstellt. BSA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde dazu in Probenpuffer gelöst, welcher in der gleichen Verdünnung vorlag wie die jeweils zu vermessenden Proben. Die für diese Standardreihe gemessenen Absorptionswerte konnten dann zur Erstellung einer Regressionsgleichung verwendet werden. Diese wurde zur Bestimmung der Konzentration unbekannter Proben verwendet. Die einmal aufgenommene Standardkurve wurde solange weiter verwendet, bis ein neues Gebinde des 5x Roti-Quant Bradford-Reagenz (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) angebrochen wurde.

4.11.38 Luciferase-Assays

Je nach zu vermessenem Ausgangsmaterial wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität verwendet:

Zur Bestimmung der LUC-Aktivität in Proteinextrakten aus *Arabidopsis*-Protoplasten wurden je 20 µl der Proteinüberstände aus Abschnitt 4.11.34 in je ein Well einer weißen 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Als Blindkontrolle wurden in ein weiteres Well 20 µl 1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Mannheim, Deutschland) pipettiert. Die Messung erfolgte am Berthold TriStar LB 941 Plattenleser. Mittels des geräteeigenen Injektors wurden 100 µl Luciferase Assay Reagent (Promega, Mannheim, Deutschland) in eines der zu messenden Wells injiziert. Danach wurde für 15 s die Lumineszenz in 0,1 s Schritten gemessen und durch das Gerät am Ende der Messung das Integral unter der Messkurve bestimmt. Dieser Wert wurde um den Wert der Blindprobe korrigiert und diente in den weiteren Analysen als Maß für die Transfektionseffizienz. Um diese einfacher vergleichen zu können, wurde jeder Wert mittels Division durch 5.000.000 RLU normiert. Die so erhaltenen dimensionslosen Werte wurden verwendet, um die ebenfalls gemessenen GUS-Aktivitäten hinsichtlich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen zu korrigieren (4.11.40).

Zur Bestimmung der LUC-Aktivität in Petersilie-Protoplasten wurden die wie unter 4.11.32 hergestellten Extrakte verwendet. Von jeder Probe wurden je 50 µl (4 µg Protein) in zwei Wells einer weißen 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Als Blindprobe wurde LUC-Extraktionspuffer verwendet. Die Messung erfolgte am Berthold TriStar LB 941 Plattenleser. Dazu wurden mittels der Injektoren des Plattenlesers 175 µl LUC-Reaktionspuffer und 50 µl Luciferin-Substratlösung zu der zu vermessenden Probe pipettiert und sofort die Lumineszenz über 15 s gemessen (Messintervall 0,1 s). Die Messwerte einer Probe wurden addiert und um den für die Blindprobe gemessenen Wert bereinigt. Analog zum Vorgehen

bei den *Arabidopsis*-Protoplasten wurde dann jeder Wert normiert (Division durch 3.529.052.500 RLU) und als Maß für die Transfektionseffizienz verwendet (4.11.40). Der zur Normalisierung verwendete Wert ist der höchste bisher gemessene Wert in diesem Assay. Jeder beliebige andere Wert ist ebenso geeignet, solange immer derselbe Wert zur Normalisierung verwendet wird.

4.11.39 Qualitative GUS-Färbungen

Die qualitativen GUS-Färbungen einzelner Pflanzenorgane (Blätter, Blüten etc.) und die quantitativen GUS-Assays (4.11.40) mit Proteinextrakten aus *Arabidopsis*- bzw. Peter-silie-Protoplasten sowie aus *Arabidopsis*-Blättern erfolgten gemäß Jefferson *et al.* (1987).

Für qualitative GUS-Assays (Färbungen) wurde das zu färbende Pflanzenmaterial mit GUS-Färbepuffer überschichtet, 2-3-mal für je 5 min einer Vakuuminfiltration unterzogen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Material in 96 % Ethanol inkubiert bis das Chlorophyll entfernt war. Zur Dokumentation und Lagerung wurden die Präparate in 70 % Ethanol überführt.

4.11.40 Quantitative GUS-Assays

Quantitative GUS-Messungen erfolgen durch Fluoreszenzmessungen, bei der die zu vermessende Probe mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und die Emission bei 460 nm gemessen wird. Die durch die β -Glucuronidase (GUS) katalysierte Umwandlung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) in fluoreszierendes 4-Methylumbelliferon (4-MU) kann so über die Zeit verfolgt werden. Der Anstieg der gemessenen Fluoreszenz in FU/s ergibt sich aus einer linearen Regression über die Messwerte einer Probe im Messzeitraum. Mittels einer Standardreihe mit ansteigenden 4-MU-Konzentrationen kann nun der Fluoreszenzanstieg (Δ FU pro Zeiteinheit) in die gebildete Produktmenge (pmol 4-MU pro Zeiteinheit) umgerechnet werden. Die Produktbildungsgeschwindigkeit pmol 4-MU/min ist ein Maß für die Aktivität bzw. Menge der β -Glucuronidase in einer Probe. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten im Berthold TriStar LB 941 bei 37 °C und einer Lampenintensität von 6.000. Je nach zu vermessender Probe unterscheidet sich das Vorgehen bei der eigentlichen Messung leicht. Im Folgenden sind daher die Protokolle für die verschiedenen Proben angegeben:

Zur Vermessung der Proteinextrakte aus *Arabidopsis*-Protoplasten (4.11.34) wurden je 25 μ l einer Probe unverdünnt in zwei Wells einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und

mit je 225 µl GUS-Reaktionspuffer (vorgewärmt auf 37 °C) versetzt. Die 96-Well Platte wurde im Berthold TriStar LB 941 für 10 min auf 37 °C vorgewärmt. Es folgte eine 60-minütige Messung (bei 37 °C), bei der jede Probe im Abstand von ca. 5 min vermessen wurde. Dazu wurde die jeweilige Probe mit einer Wellenlänge von 360 nm (Lampenintensität 6.000) angeregt und die Emission bei 460 nm für 1 s gemessen. Die sich ergebenden Werte (pmol 4-MU/min) wurden durch die entsprechenden normierten LUC-Werte (4.11.38) dividiert, um den Einfluss schwankender Transfektionseffizienzen auszugleichen. Eine Berücksichtigung der Proteinkonzentration erfolgte im Gegensatz zur Messung von Extrakten aus Petersilie-Protoplasten nicht, da der hier verwendete Lysis-Puffer nicht für Proteinbestimmungen nach Bradford geeignet ist. Weiterhin ist die Proteinkonzentration für andere verfügbare Methoden zu gering. Der Einsatz der immer gleichen Protoplastenmenge pro Transfektion gleicht diesen Nachteil aber aus.

Zur Vermessung von Extrakten aus Petersilie-Protoplasten (4.11.32) sowie aus Gewebeproben von *Arabidopsis*-Pflanzen (4.11.36) wurde zunächst die Proteinkonzentration bestimmt (4.11.37) und im jeweiligen Probenpuffer auf 80 µg/ml eingestellt. Davon wurden, genau wie bei Extrakten aus *Arabidopsis*-Protoplasten, 25 µl (2 µg Protein) vermessen (s.o.). Da die GUS-Aktivitäten in diesen Proben z.T. aber sehr niedrig waren, wurde anstatt 60 min ca. 3 h mit einem Messintervall von 15 min gemessen. Bei Vermessung von Extrakten aus Gewebeproben Pathogen-infizierter Reportergenpflanzen konnten die erhaltenen Werte direkt in pmol 4-MU/(min*mg) umgerechnet werden, da die eingesetzte Proteinkonzentration bekannt und keine weitere Normierung oder Korrektur der Werte nötig war.

Die in Petersilie-Protoplasten gemessenen GUS-Aktivitäten wurden mittels der ebenfalls bestimmten, normierten LUC-Werte (4.11.38) korrigiert. Dazu wurde jeder GUS-Wert durch den entsprechenden normierten LUC-Wert dividiert. Für die Analyse Pep25-behandelter Protoplasten wurde ein GUS-Wertepaar (mit bzw. ohne Pep25) nur durch den LUC-Wert der Probe dividiert, die nicht mit Pep25 behandelt wurde. Dies war nötig, da die Pep25-Applikation unabhängig von der Transfektionseffizienz zu deutlich reduzierten LUC-Aktivitäten führte und somit die Ergebnisse evtl. verfälscht würden. Da beide LUC-Werte eines Wertepaares aus demselben Transfektionsansatz stammen und erst nach der Transfektion aufgeteilt wurden, ist dieses Vorgehen zulässig.

4.11.41 Analyse von Promotorsequenzen mittels POBO

Das Web-Tool POBO (<http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/poxo/pobo>, Kankainen und Holm, 2004) ermöglicht es, in einem Satz von Sequenzen (z.B. Promotoren koregulierter Gene)

nach dem Auftreten einer bestimmten Nukleotid-Sequenz zu suchen. Die Häufigkeit der Sequenz wird von dem Tool mit einem Hintergrundmodell verglichen. Hierfür können z.B. alle Promotorsequenzen des *A. thaliana*-Genoms ausgewählt werden. Mittels Bootstrapping-Analyse erstellt das Tool Statistiken (t-Test und ANOVA), um die Signifikanz einer möglichen Anreicherung zu ermitteln. Das Tool kann zwei verschiedene Sequenzgruppen (z.B. zwei verschiedene Gruppen koregulierter Gene) jeweils mit dem Hintergrundmodell und untereinander hinsichtlich der Häufigkeit der gesuchten Sequenz vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gruppen von jeweils 100 koregulierten Genen analysiert. Deutlich mehr als 100 Gene können mit POBO nicht analysiert werden, da es eine Obergrenze für die zu analysierende Nukleotid-Anzahl gibt. Die AGIs der jeweiligen Gene wurden aus entsprechenden Publikationen extrahiert und die Promotorsequenzen via TAIR (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/sequences/index.jsp>) heruntergeladen. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass zu jeder AGI die ersten 500 bp upstream des TSS bzw. upstream des Start-Codons erhalten wurden (TAIR10 Loci Upstream Seq. -500 bp). Die so erhaltenen FASTA-Sequenzen wurden als Cluster 1 bzw. Cluster 2 an das POBO Web-Tool übergeben. Für die Analyse wurde die Funktion „Search consensus pattern“ aktiviert und die gewünschte Sequenz als Suchbegriff eingegeben. Als Hintergrundmodell wurde das *A. thaliana*-Genom (*arabidopsis_thaliana_clean*) gewählt. Für die Bootstrapping-Analyse wurde die Größe der Pseudocluster auf 100 Promotoren und die Zahl der zu generierenden Pseudocluster auf 1.000 gesetzt. Die Länge der Sequenzen in den Pseudoclustern wurde auf 500 bp festgelegt.

Zur Bewertung der Signifikanz der Ergebnisse wurden die für jeden Cluster-Hintergrund bzw. Cluster-Cluster Vergleich ausgegebenen t-Werte (t-Test) in einen p-Wert umgerechnet. Hierzu wurden der t-Wert und die Zahl der Freiheitsgrade (beides von POBO ausgegeben) in ein online-Tool eingeben (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/pValue1/>). Ein kleiner p-Wert ($p < 0,0001$) wird als starker Hinweis darauf gewertet, dass die Null-Hypothese (beide Cluster sind gleich) zugunsten der Alternative (die Sequenz ist zwischen beiden Clustern ungleich verteilt) verworfen werden kann.

Die zweite statistische Größe, die von POBO ermittelt wird, ist der F-Faktor. Dieser wird mittels einer ANOVA-Analyse berechnet und spiegelt wieder, wie gut das eingegebene Motiv zwischen den koregulierten Genen diskriminiert. Je größer der F-Faktor, desto besser ist die Einteilung der Gruppen mit dem Auftreten der Sequenz assoziiert (Kankainen und Holm, 2004).

5. Ergebnisse

5.1. Die Pep25-responsive Region in 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 enthält die Kernsequenz der Motivgruppe 27

Die Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 sind im Petersilie-Protoplasten-System responsiv auf Pep25 (Koschmann *et al.*, 2012). Beide gehören zur Motivgruppe 27 und teilen sich die konservierte Kernsequenz GACTTTT bzw. TACTTTT. Um zu klären, ob dieser Teil der Sequenzen für die Pep25-Responsivität verantwortlich ist oder z.B. flankierende Sequenzen einen Einfluss haben, wurde eine Reihe von mutierten 30I-8_M1S1- bzw. 27D-10_M1S2-Sequenzen auf Pep25-Responsivität untersucht. Alle Mutationen basieren auf einer Transition der jeweiligen Basen. Ausnahmen wurden nur gemacht, wenn es durch die Mutationen zur Neubildung möglicherweise relevanter Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS, z.B. W-Box) kam. Mit Hilfe von Marlies Becker wurden die so erstellten Mutationen als Tetramere in pBT10GUS/LUC kloniert (4.11.16) und auf ihre Pep25-Responsivität in Petersilie-Protoplasten untersucht (4.11.32).

Die für 30I-8_M1S1 erstellten Mutationen sind zusammen mit den flankierenden Linkersequenzen, die bei der Tetramerisierung entstehen, in Abbildung 5 a gezeigt. Da durch die Linker auch potentielle neue *cis*-Sequenzen entstehen können, werden diese so dargestellt, wie sie bei einem Tetramer flankierend zu den beiden zentralen Wiederholungen der Einzelsequenz auftreten. Die Linkersequenzen vor der ersten bzw. nach der letzten Kopie der Einzelsequenz lauten ACTAGT bzw. ACTAGA. Abbildung 5 b zeigt die Mittelwerte aus allen unabhängig durchgeführten Versuchen für die Sequenz 30I-8_M1S1 und die entsprechenden Mutationen 1-5 (Anhang 2 zeigt die Einzelwerte dieser und der folgenden Messungen). Die Induzierbarkeit der nicht mutierten 30I-8_M1S1-Sequenz dient hier als Vergleichswert. Es ist erkennbar, dass lediglich bei Mutation 4 die Pep25-Responsivität erhalten bleibt. Bei allen anderen Mutationen ist diese nicht mehr vorhanden bzw. deutlich reduziert. Folglich ist der durch die Mutationen 1 bis 3 abgedeckte Bereich essentiell für die Responsivität. Die Kernsequenz GACTTTT, die durch Mutation 5 betroffen ist, liegt innerhalb dieses Bereiches und ist folglich auch essentiell. Anhang 2

Um eine weitere Eingrenzung des Pep25-responsiven Bereichs zu erlauben, wurden zusätzliche Mutationen entworfen, welche auf den durch die o.g. Mutationen abgedeckten Bereich abzielen. Die Mutationen 6-10 sind jeweils vier Nukleotide lang und überlappen um je ein

Nukleotid (Abbildung 6 a). Auch diese Sequenzen wurden auf ihre Induzierbarkeit durch Pep25 untersucht. Die Mittelwerte aus allen unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 6 b gezeigt (Einzelwerte in Anhang 2)

a

30l-8_M1S1	tctagt	<u>ACAACAGACGACTTTTCATAATTCA</u>	tctagt
Mut1	tctagt	GTGGTGAG -----	tctagt
Mut2	tctagt	----- AGTAGTCC -----	tctagt
Mut3	tctagt	----- CCCCTGCG -----	tctagt
Mut4	tctagt	----- CGGCCTG -----	tctagt
Mut5	tctagt	----- AGTCCCC -----	tctagt

b

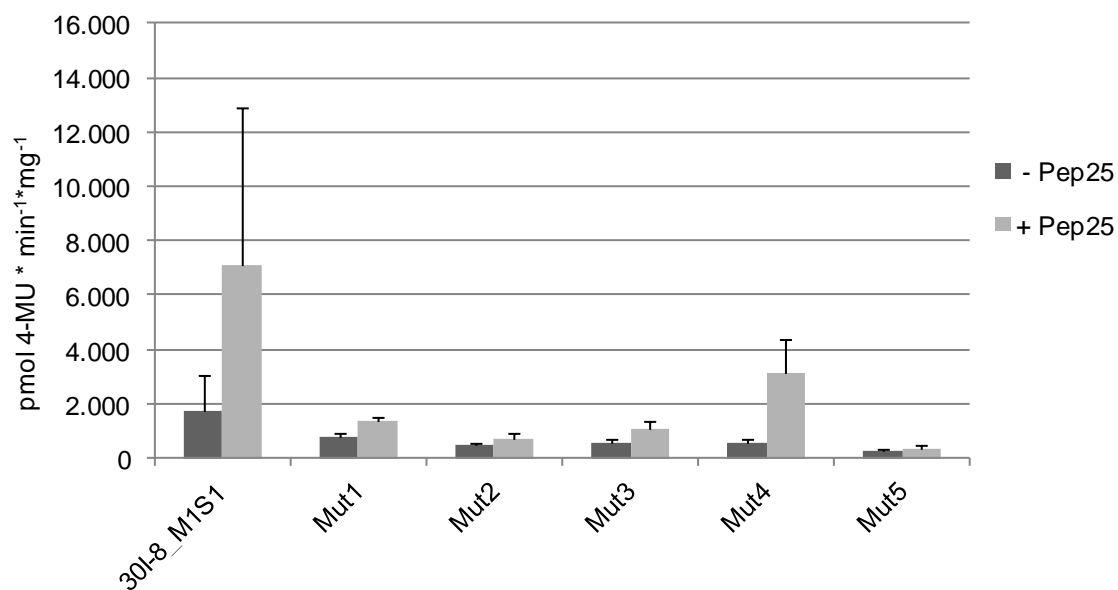


Abbildung 5: Pep25-Responsivität der Mutationen 1-5 der Sequenz 30l-8_M1S1

(a) Mutationen 1-5. Die Sequenzveränderungen sind in rot gezeigt, die potentielle Kernsequenz ist unterstrichen. Die flankierende Sequenz, die durch die Tetramerisierung entsteht, ist ebenfalls gezeigt (grau). (b) Pep25-Responsivität der Mutationen in Petersilie-Protoplasten. Mittelwerte aus je drei unabhängigen Experimenten.

Anhand der erhaltenen Werte lässt sich feststellen, dass bei allen untersuchten Mutationen, bis auf Mutation 6, die Pep25-Responsivität verloren geht bzw. sehr deutlich reduziert ist. Die vier durch Mutation 6 betroffenen Nukleotide sind daher für die Induktion durch Pep25 nicht essentiell. Es verbleiben somit 12 Nukleotide die für die Responsivität notwendig erscheinen (Abbildung 6, roter Rahmen). Diese 12 Nukleotide enthalten die potentielle Kernsequenz GACTTTT der Motivgruppe 27.

a

30I-8_M1S1	tctagt	ACAA	<u>CAGACGACTTTT</u>	CATAATTCA	tctagt
Mut6	tctagt	GTGG	-----	-----	tctagt
Mut7	tctagt	---G	TGA	-----	tctagt
Mut8	tctagt	-----	AGTA	-----	tctagt
Mut9	tctagt	-----	AGTC	-----	tctagt
Mut10	tctagt	-----	CCCC	-----	tctagt

b

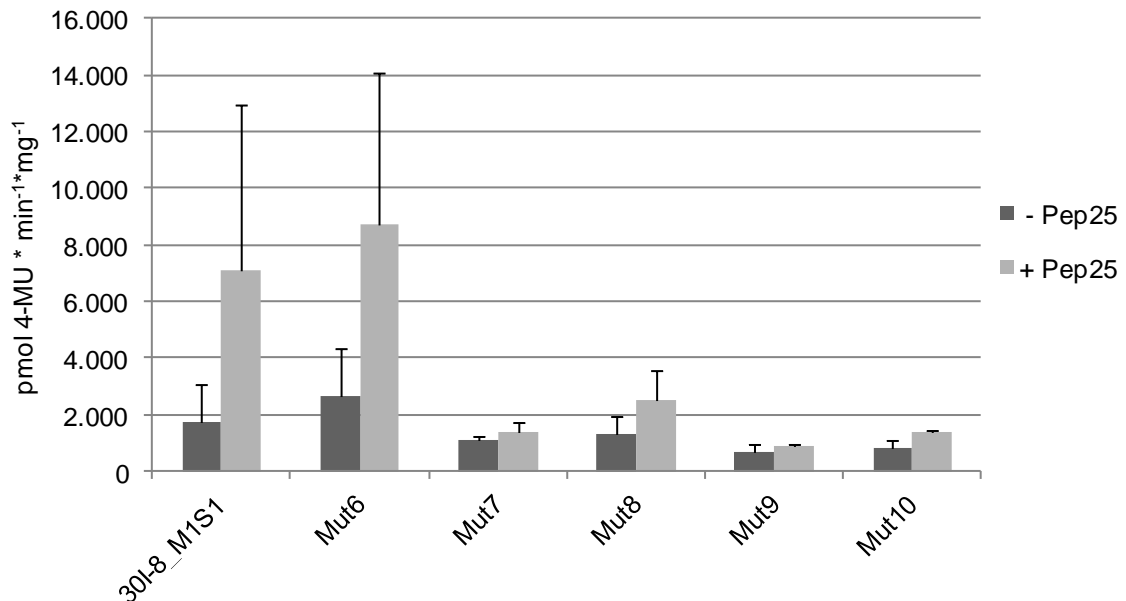


Abbildung 6: Pep25-Responsivität der Mutationen 6-10 der Sequenz 30I-8_M1S1

(a) Mutationen 6-10. Die Sequenzveränderungen sind in rot gezeigt. Die potentielle Kernsequenz ist unterstrichen und der identifizierte Pep25-responsive Bereich eingerahmt. Die flankierende Sequenz, die durch die Tetramerisierung entsteht, ist ebenfalls gezeigt (grau). (b) Pep25-Responsivität der Mutationen in Petersilie-Protoplasten. Mittelwerte aus je zwei unabhängigen Experimenten.

Analog zum obigen Vorgehen wurden auch für die Sequenz 27D-10_M1S2 zunächst fünf Mutationen entworfen, welche mit Überlappungen die gesamte Sequenz abdecken (Abbildung 7 a). Mit Hilfe von Marlies Becker wurde auch diese Serie von Mutationen in Petersilie-Protoplasten auf Ihre Pep25-Responsivität untersucht. Abbildung 7 b zeigt die Ergebnisse im Vergleich zur unveränderten 27D-10_M1S2-Sequenz (Einzelwerte aller Mutationen: Anhang 3). In diesem Fall ist erkennbar, dass nur die Mutationen 2, 3 und 5 einen vollständigen Verlust der Pep25-Responsivität bewirken. Diese Mutationen und damit der essentielle Sequenzabschnitt, erstrecken sich über einen 16 Nukleotide umfassenden Bereich.

a

27D-10_M1S2	actaga	<u>CTCAAAGAATACTTTTCAAAGTGAACA</u>	actaga
Mut1	actaga	-----ACAGGAC-----	actaga
Mut2	actaga	-----CCCTGGGAC-----	actaga
Mut3	actaga	-----AGGCGTCCC-----	actaga
Mut4	actaga	ACTGGGAG-----	actaga
Mut5	actaga	-----CGTCCCC-----	actaga

b

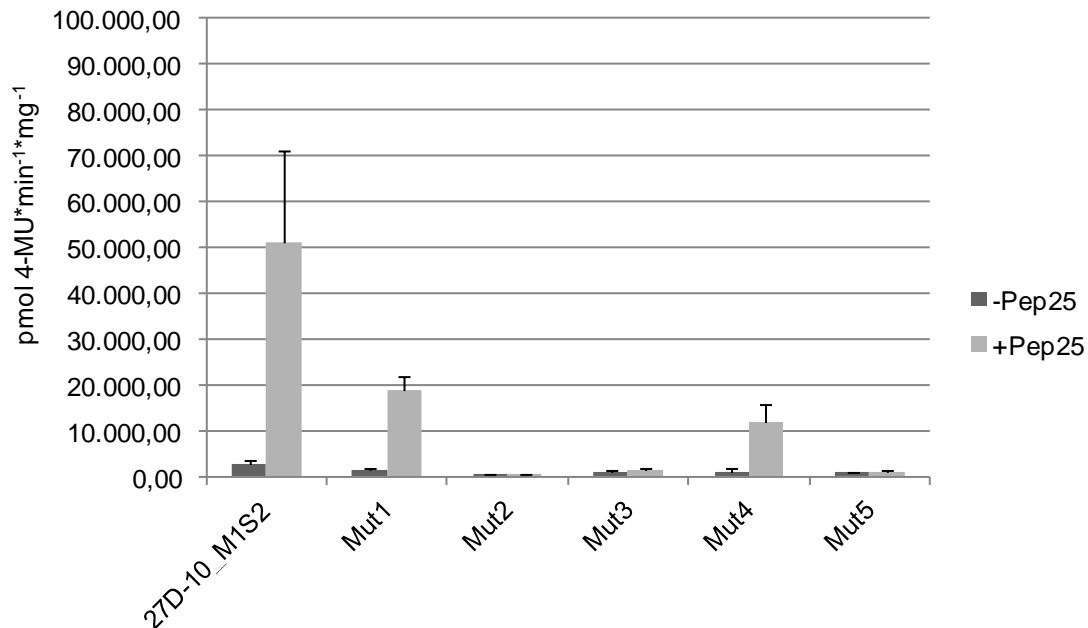


Abbildung 7: Pep25-Responsivität der Mutationen 1- 5 von 27-D10_M1S2

(a) Sequenzen verschiedener Mutationen der 27D-10_M1S2-Sequenz. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Originalsequenz sowie die Mutationen bezogen auf die Promotorsequenz des zugehörigen Gens revers komplementär angegeben. Entsprechend sind auch die Linkersequenzen aus dem synthetischen Promotor revers komplementär. Dies gilt auch für alle weiteren Abbildungen mit 27D-10_M1S2. Die potentielle Kernsequenz ist unterstrichen und die Sequenzveränderungen sind rot gezeigt. Die flankierende Sequenz, die durch die Tetramerisierung entsteht, ist ebenfalls gezeigt (grau). (b) Pep25-Responsivität der Mutationen in Petersilie-Protoplasten. Mittelwerte aus je drei unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Eingrenzung des Pep25-responsiven Bereichs, wurden auch hier fünf zusätzliche Mutationen (jeweils 4 bp) entworfen (Abbildung 8 a) und auf gleiche Weise in Petersilie-Protoplasten analysiert. Anders als bei 30I-8_M1S1 ergibt die Analyse dieser Mutationsreihe, dass eine weitere Eingrenzung der für die Pep25-Responsivität nötigen Sequenz auf diese Weise nicht möglich ist: Alle fünf Mutationen bewirken einen vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit durch Pep25-Applikation (Abbildung 8 b). Die Pep25-responsive Region erstreckt sich somit auf 16 Nukleotide (Abbildung 8 a, roter Rahmen).

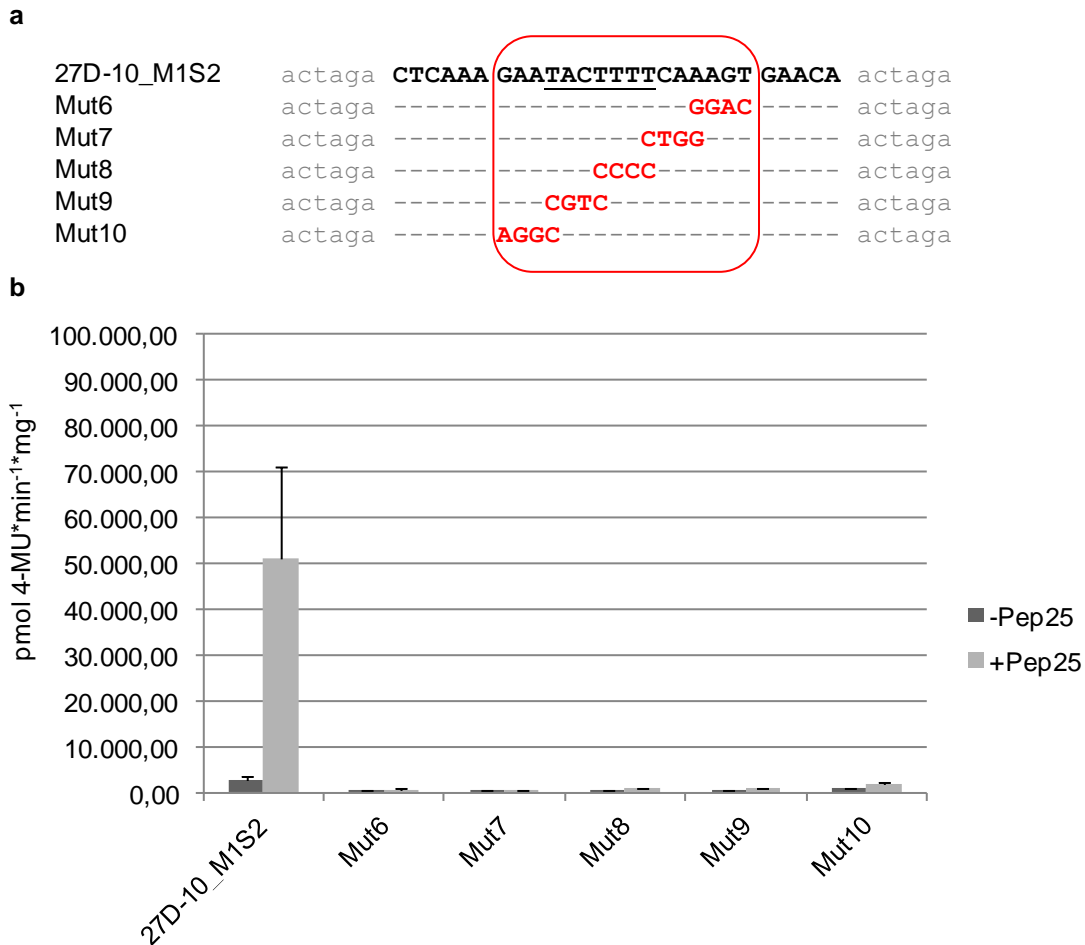


Abbildung 8: Pep25-Responsivität der Mutationen 6-10 von 27D-10_M1S2

(a) Sequenzen verschiedener Mutationen der 27D-10_M1S2-Sequenz. Die potentielle Kernsequenz ist unterstrichen und die Sequenzveränderungen sind in rot gezeigt. Die flankierende Sequenz, die durch die Tetramerisierung entsteht, ist ebenfalls gezeigt (grau). Die durch Mutationsanalyse eingegrenzte Pep25-responsive Region ist eingerahmt. (b) Pep25-Responsivität der Mutationen in Petersilie-Protoplasten. Mittelwerte aus je drei unabhängigen Experimenten.

Wie auch bei 30I-8_M1S1 enthalten die essentiellen Nukleotide der 27D-10_M1S2-Sequenz den in Motivgruppe 27 hoch konservierten Kernbereich. In 27D-10_M1S2 handelt es sich dabei aber um die leicht abgewandelte TACTTTT-Sequenz (Abbildung 8). Ein Vergleich der beiden Sequenzen zeigt, dass der Pep25-responsive Bereich beider Sequenzen überlappt, bzw. sehr ähnlich ist (Abbildung 9). Der überlappende Bereich enthält die Gruppe 27-Kernsequenz. Folglich könnte diese ausschlaggebend für die Pep25-Responsivität sein.

30I-8_M1S1	tctagt	acaA	<u>CA GA</u>	<u>cgACTTTT</u>	CA	AaT	tcaA	tctagt
27D-10_M1S2	actaga	ctcA	aA	<u>GAat</u>	<u>ACTTTT</u>	CA	AaT	gaAca actaga

Abbildung 9: Alignment der 30I-8_M1S1- und 27D-10_M1S2-Sequenzen

Identische Nukleotide sind in Großbuchstaben gedruckt, Abweichungen und die Linkersequenz (grau) in Kleinbuchstaben. Die Pep25-responsive Region ist jeweils eingerahmt.

5.2. 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 vermitteln eine leichte Reporter-genaktivität in nicht Pathogen-infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen

Vor dem Hintergrund der bei Koschmann (Koschmann *et al.*, 2012) beschriebenen Pep25-Responsivität der *cis*-Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 sowie der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, sollte die Übertragbarkeit der Funktionalität dieser Sequenzen in andere Systeme untersucht werden. Ein wichtiges Experiment war dabei die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Funktionsanalyse mittels *Agrobacterium*-Infiltration an *Nicotiana benthamiana*. Beide *cis*-Sequenzen vermitteln in diesem heterologen System Reporter-genaktivität. Die entsprechenden Ergebnisse sind bei Koschmann *et al.* publiziert (Koschmann *et al.*, 2012) und in Anhang 4 gezeigt. Die Funktionalität in diesem zweiten, heterologen System war eine wichtige Voraussetzung für weitere Untersuchungen im homologen System *A. thaliana*. Auch in *Arabidopsis* sollte nun geklärt werden, ob die neuen *cis*-Sequenzen funktionell sind bzw. Pathogen-Responsivität vermitteln.

Zunächst wurde untersucht, ob die synthetischen Promotoren auch ohne Pathogeninfektion Reporter-genaktivität vermitteln. Es wurden hierfür die in Abschnitt 4.11.15 beschriebenen T-DNA-Vektoren erstellt. Diese tragen die jeweilige *cis*-Sequenz als Tetramer vor dem *uidA* (GUS)-Reportergen und wurden mittels der Floral Dip Methode (4.11.35) in *A. thaliana* Col-0-Pflanzen transformiert. Als Kontrollen wurden neben den beiden zu untersuchenden Sequenzen auch die Konstrukte 4xD-pGPTV_bar, TATA-pGPTV_bar und 35S-pGPTV_bar in *A. thaliana* transformiert. Bei 4xD handelt es sich um eine bereits als Pathogen-responsiv beschriebene Sequenz (Rushton *et al.*, 2002). TATA-pGPTV_bar trägt den 35S-Minimalpromotor (TATA-Box) aus pBT10-GUS vor dem GUS-Gen, während 35S-pGPTV_bar den vollständigen 35S-Promotor enthält. Die Selektion auf transgene Pflanzen mittels Phosphinotricin führte zur Identifikation der in Anhang 5 aufgelisteten Primärtransformanten (T_0). Nach Selbstung der T_0 -Pflanzen wurden die erhaltenen Samen erneut auf Selektionsmedium ausgesät, um das Verhältnis von resistenten (transgenen) zu sensiblen (nicht-transgenen) Pflanzen in der T_1 -Generation und damit die Zahl der T-DNA-Loci zu bestimmen (Anhang 5).

Die so erhaltenen transgenen Linien wurden zunächst mittels histochemischer GUS-Assays (4.11.39) hinsichtlich der Grundaktivität der enthaltenen Promotor-Reporter-genkonstrukte untersucht. Dazu wurden Keimlinge unter sterilen Bedingungen auf Selektionsmedium angezogen (Langtagbedingungen) und sieben bzw. 14 Tage nach Keimung einer GUS-Färbung unterzogen. Zur Analyse adulter Pflanzen wurden Keimlinge 14 Tage nach Keimung in Erde

transferiert und ebenfalls unter Langtagbedingungen weiter inkubiert. Im Alter von sechs bis acht Wochen wurden die Wurzeln, Blätter, Stängel, Blüten sowie reife Samenschoten ebenfalls einer GUS-Färbung unterzogen.

Die Kontrollen TATA-pGPTV_bar und 35S-pGPTV_bar zeigen bei den Färbungen der sieben bzw. 14 Tage alten Keimlinge das erwartete Bild. Während der Minimalpromoter keine histochemisch nachweisbare GUS-Aktivität vermittelt, zeigen die fünf 35S-pGPTV_bar Linien eine Blaufärbung (Anhang 6). Diese fällt je nach Linie sehr unterschiedlich aus, was vermutlich mit Positionseffekten und der Zahl der T-DNA-Loci zusammen hängt. Auf eine Untersuchung der TATA und 35S-Konstrukte in adulten Pflanzen wurde verzichtet. Stattdessen wurden die Linien TATA #5 und 35S #5 als technische Kontrollen in den entsprechenden Experimenten zur Untersuchung der synthetischen Promotoren 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 mitgeführt.

Die Analyse der vier 4xD-Linien ergab in nahezu allen Präparaten keine nachweisbare GUS-Aktivität in den Keimlingen. Auch die Färbungen an adulten Pflanzen belegen, dass nur wenig Grundaktivität vorliegt. Es treten zwar an einzelnen Präparaten leichte Blaufärbungen auf (vgl. Anhang 7), diese sind aber weder für die Präparate einer Linie noch für alle anderen untersuchten Linien repräsentativ.

Die Analyse der Grundaktivität in den 30I-8_M1S1-Linien im Keimlingsstadium (sieben und 14 Tage) ergibt ein heterogenes Bild. In fast allen Linien ist eine Färbung in mindestens einem der untersuchten Individuen feststellbar. Diese tritt allerdings unregelmäßig in Blättern, Wurzeln und Hypokotyl auf und ist meist schwach. Weiterhin ist die Färbung häufig nicht flächig, sondern konzentriert sich auf kleinere Bereiche (Bsp. in Abbildung 10 a, alle Bilder in Anhang 8). Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Grundaktivität des synthetischen Promotors in den Keimlingen hin. Bei der Färbung von Organen adulter Pflanzen verdeutlicht sich dieses Bild (Bsp. in Abbildung 10 b, Anhang 9). Zusammenfassend treten hier deutlichere Färbungen hauptsächlich in den Blättern sowie im Stängel auf. Auch diese treten zumeist nicht flächig auf, sondern betreffen z.B. nur Teile des Blattes. In adulten Pflanzen scheint die beobachtete Grundaktivität also erhalten zu bleiben und evtl. sogar verstärkt zu sein. Diese ist allerdings auch hier heterogen.

Die 27D-10_M1S2-Linien wurden analog zu 30I-8_M1S1 den GUS-Färbungen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität unterzogen. Insgesamt zeigen die Pflanzen im Keimlingsstadium ähnlich wie 30I-8_M1S1 leichte Grundaktivität, welche insgesamt aber weniger häufig zu beobachten ist (Abbildung 11 a, Anhang 10). Diese Beobachtung setzt sich auch in den Organen adulter Pflanzen fort. Hier tritt nur in drei der untersuchten Linien eine z.T. sehr

schwache Färbung in den Blättern auf. Stängel, Wurzel, Blüten und Samenschoten zeigen keine Färbungen (Bsp. in Abbildung 11 b, alle Fotos in Anhang 11).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die meisten 30I-8_M1S1- und 27D-10_M1S2-Linien in *Arabidopsis* in Abwesenheit von Pathogenen eine leichte bzw. keine Aktivität des Reportergens GUS vermitteln. Bei 30I-8_M1S1 tritt in Blättern adulter Pflanzen die deutlichste Aktivität auf.

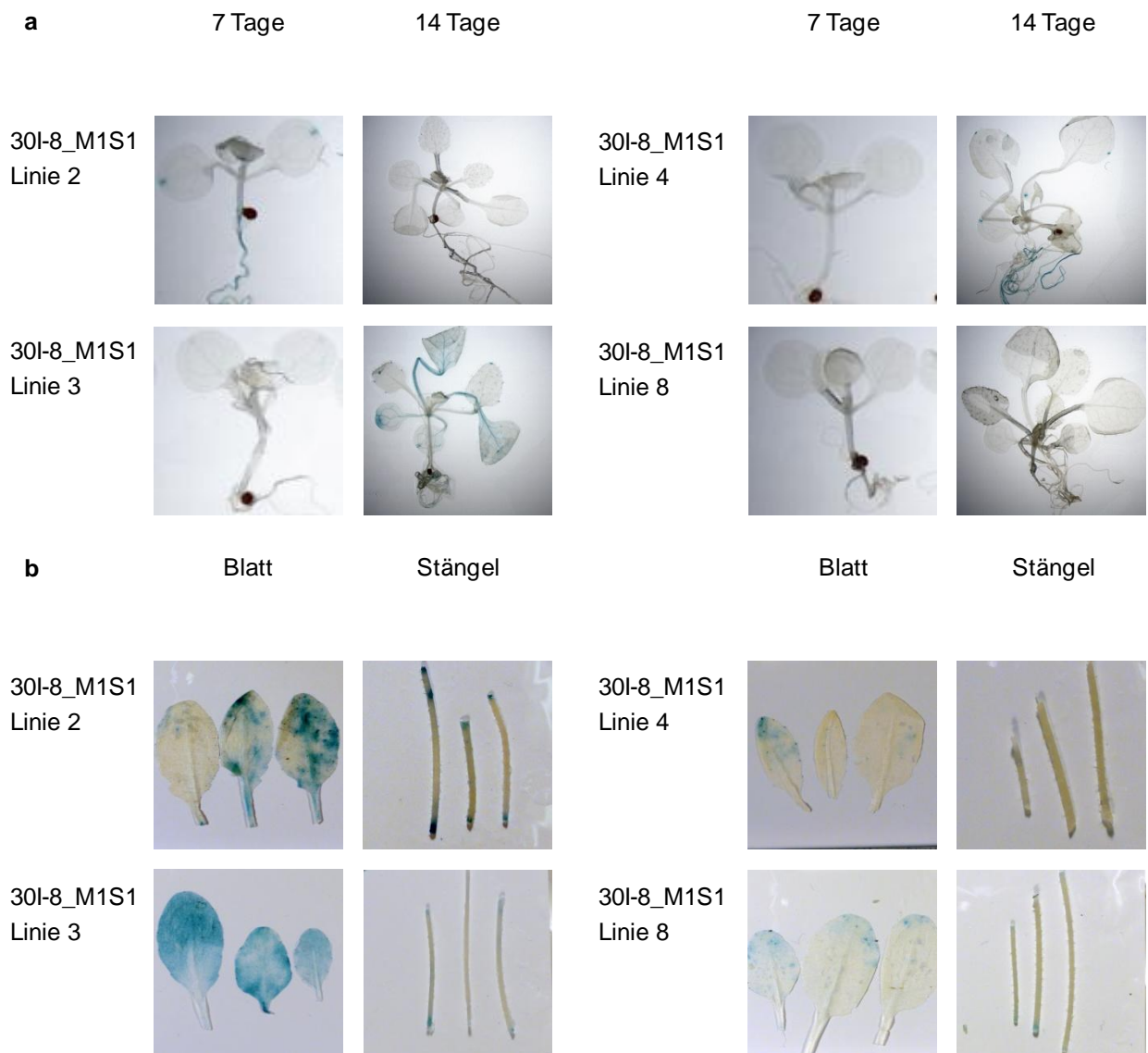


Abbildung 10: GUS-Färbungen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität in transgenen 30I-8_M1S1-Pflanzen

(a) Färbung von sieben bzw. 14 Tage alten Keimlingen aus Sterilkultur. (b) Färbung von Blättern und Stängeln sechs bis acht Wochen alter Pflanzen aus Erdkultur.

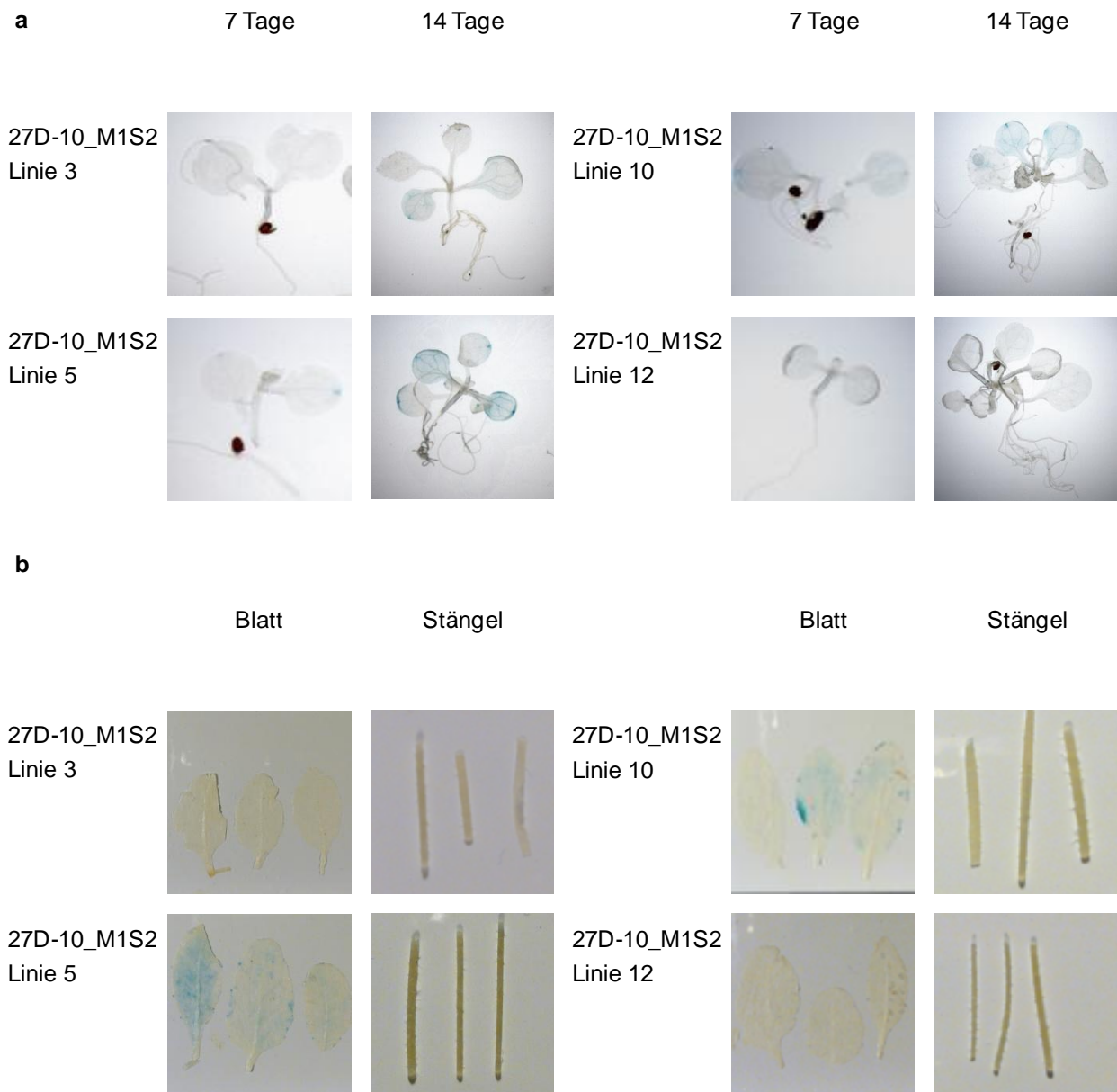


Abbildung 11: GUS-Färbungen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität in transgenen 27D-10_M1S2-Pflanzen

(a) Färbung von sieben bzw. 14 Tage alten Keimlingen aus Sterilkultur. (b) Färbung von Blättern und Stängeln sechs bis acht Wochen alter Pflanzen aus Erdkultur.

5.3. 30I-8_M1S1- und 27D-10_M1S2-Pflanzen zeigen bei *B. cinerea*-Infektion eine leichte Pathogen-Responsivität

Neben der basalen Aktivität der synthetischen Promotoren 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 in Abwesenheit von Pathogenen (vgl. 5.2) ist besonders eine mögliche Pathogen-Responsivität der Sequenzen interessant. Um zu untersuchen, ob durch Infektion mit Pathogenen eine Induktion der Reportergenaktivität erreicht werden kann, wurden daher verschiedene transgene *Arabidopsis*-Linien unterschiedlichen Pathogeninfektionen ausgesetzt (4.11.36). Die dabei verwendeten Pathogene waren der nekrotrophe Pilz *B. cinerea* sowie eine virulente und eine avirulente Form des bakteriellen, hemibiotrophen Pathogens *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000). Die Infektionen mit den verschiedenen Pathogenen erfolgten wie unter Abschnitt 4.11.36 beschrieben. Die infizierten Blätter bzw. die nicht infizierten Kontrollblätter wurden zwei Tage nach Infektion (2 dpi, bei *Pto* DC3000-Infektionen) bzw. drei Tage nach Infektion (3 dpi, bei *B. cinerea*-Infektionen) geerntet. Es wurden anschließend qualitative GUS-Färbungen bzw. quantitative GUS-Messungen durchgeführt (4.11.39 und 4.11.40). Als Kontrollen dienten dabei stets 35S-, TATA- und 4xD-pGPTV_bar-Pflanzen. Die 35S- und TATA-Pflanzen (jeweils Linie 5) dienten als technische Kontrollen für die GUS-Assays, während eine transgene 4xD-Linie als Positivkontrolle für die Pathogen-Responsivität eingesetzt wurde. Hierbei wurden stets Pflanzen der 4xD Linie 3 verwendet, da diese durch die Pathogeninfektionen besonders stark induziert sind (Daten nicht gezeigt). Für die Infektionsexperimente wurden von den zur Verfügung stehenden 30I-8_M1S1- bzw. 27D-10_M1S2-Linien jeweils fünf ausgewählt, welche nur einen T-DNA Locus tragen (vgl. Anhang 5). Dies sind bei 30I-8_M1S1 die Linien 3, 6, 8, 13 sowie 14 und bei 27D-10_M1S2 die Linien 1, 4, 7, 9 und 12.

Bei Infektion der 30I-8_M1S1-Pflanzen mit *B. cinerea* trat bei keiner der untersuchten Linien eine reproduzierbare Färbung an den Infektionsstellen auf. Zwar zeigen einige Blätter schwach blaugefärbte Bereiche, diese treten aber auch an nicht infizierten Kontrollen auf und sind nicht mit der Infektionsstelle zu assoziieren. Abbildung 12 zeigt einige ausgewählte Bilder sowie zum Vergleich die Kontrollen 4xD und 35S (Alle übrigen Bilder finden sich im Anhang 12.) Erkennbar ist, dass bei den Blättern der technischen Kontrolle (35S-Pflanzen) eine deutliche Blaufärbung an infizierten sowie nicht infizierten Blättern vorhanden ist. Außerdem ist erwartungsgemäß GUS-Aktivität in den infizierten Blättern der 4xD-Kontrolle nachweisbar. Diese tritt besonders intensiv am Rand der durch *B. cinerea* verursachten Läsion auf.

Da die GUS-Färbungen nur eine begrenzte Sensitivität haben, wurden parallel quantitative Messungen der GUS-Aktivität in infizierten sowie nicht infizierten Blättern durchgeführt. Die in Abbildung 13 gezeigten Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten zeigen, dass in



Abbildung 12: GUS-Färbungen an *B. cinerea* infizierten bzw. nicht infizierten Blättern verschiedener 30I-8_M1S1-Linien

Zum Vergleich sind die Kontrollen 4xD bzw. 35S gezeigt. Die Pfeile markieren die Infektionsstelle (3 dpi).

allen fünf untersuchten 30I-8_M1S1-Linien nach Infektion mit *B. cinerea* eine erhöhte GUS-Aktivität messbar ist. Die Stärke der Induktion sowie die absoluten Werte fallen dabei je nach Linie deutlich unterschiedlich aus. Das Verhältnis von induzierten zu nicht induzierten GUS-Aktivitäten (Induktionsfaktor) bewegt sich bei den fünf Linien zwischen 1,2 und 7,6 (vgl. Anhang 12). Im Vergleich zu den Kontrollen 35S und 4xD (infiziert) fallen die GUS-Aktivitäten sehr niedrig aus (vgl. Abbildung 13). Während die verwendeten Kontrollen einige Tausend $\text{pmol } 4\text{-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und einen Induktionsfaktor von 54,8 (4xD) erreichen, liegen die entsprechenden Werte der 30I-8_M1S1-Linien fast alle deutlich unter $500 \text{ pmol } 4\text{-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Diese sehr schwachen GUS-Aktivitäten sind offensichtlich mit den in Abbildung 12 gezeigten GUS-Färbungen nicht mehr zuverlässig nach-

zuweisen. Die quantitativen Messungen alleine zeigen dennoch eine Induktion von 30I-8_M1S1 durch *B. cinerea*, auch wenn diese sich in sehr niedrigen Bereichen bewegt.

Neben Infektionen mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* wurden auch Infektionen mit zwei Stämmen des hemibiotrophen Bakteriums *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (virulent bzw. avirulent) an den 30I-8_M1S1-Reporterlinien durchgeführt. Auch hier ergibt sich aus den GUS-Färbungen infizierter Blätter kein klares Ergebnis. Zwar treten an einigen infizierten Blättern Blaufärbungen auf, allerdings sind diese entweder nicht eindeutig mit der Infektion assoziiert (d.h. die nicht infizierte Kontrolle weist auch Färbung auf), oder aber die Färbungen waren nicht reproduzierbar (vgl. Anhang 13 und Anhang 14).

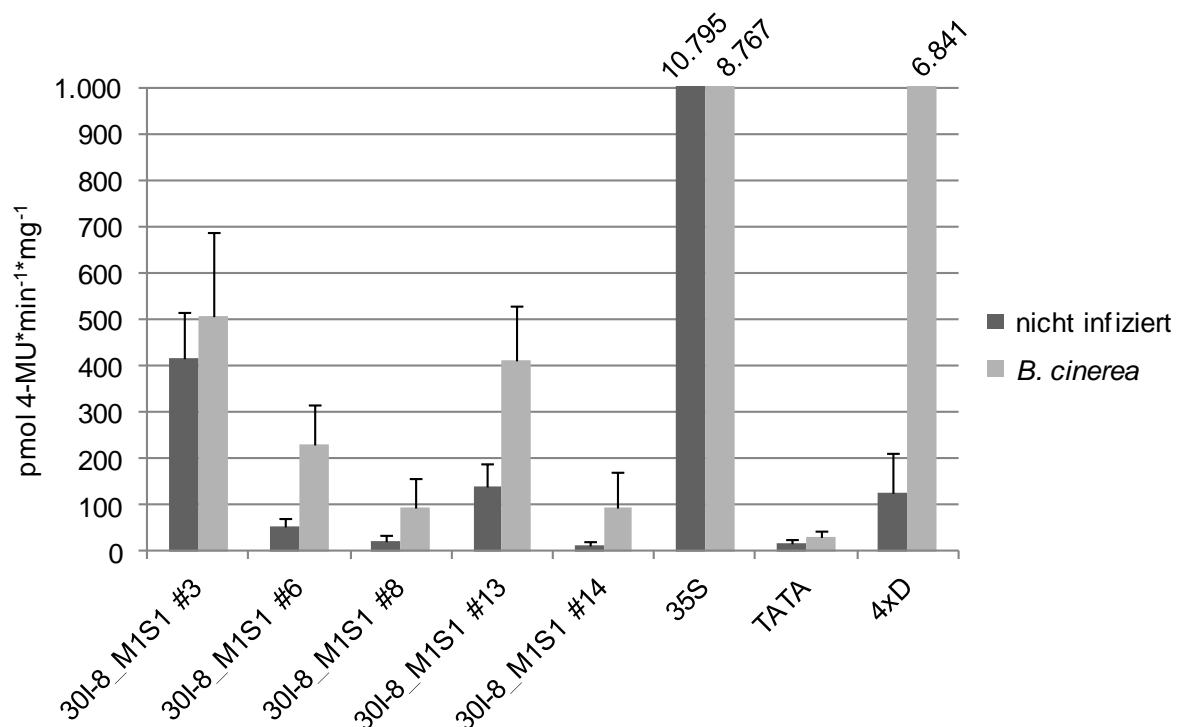


Abbildung 13: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an *B. cinerea* infizierten bzw. nicht infizierten 30I-8_M1S1-Pflanzen

GUS-Aktivität in infizierten bzw. nicht infizierten Blättern (3 dpi). Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Aus den o.g. Gründen wurden zusätzlich quantitative GUS-Messungen durchgeführt (Mittelwerte in Abbildung 14, Einzelwerte in Anhang 13 und Anhang 14). Die GUS-Aktivitäten in *Pto* DC3000 (virulent)-infizierten Blättern unterscheiden sich im Mittel nicht von denen in nicht infizierten Blättern (Abbildung 14 a). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Infektion mit dem avirulenten *Pto* DC3000 *avrRPM1*-Stamm (Abbildung 14 b). Zwar zeigen die Linien 3, 6 und 13 nach Infektion eine erhöhte GUS-Aktivität, die Induktion fällt aber deutlich schwächer aus

als nach Infektion mit *B. cinerea* (vgl. Abbildung 13). Auch hier wird beim Vergleich mit den Kontrollen 35S und 4xD deutlich, dass die absoluten GUS-Aktivitäten die in den 30I-8_M1S1-Linien erreicht werden, nur gering sind und mindestens eine 10er-Potenz unter den in den Kontrollen gemessenen Werten liegen.

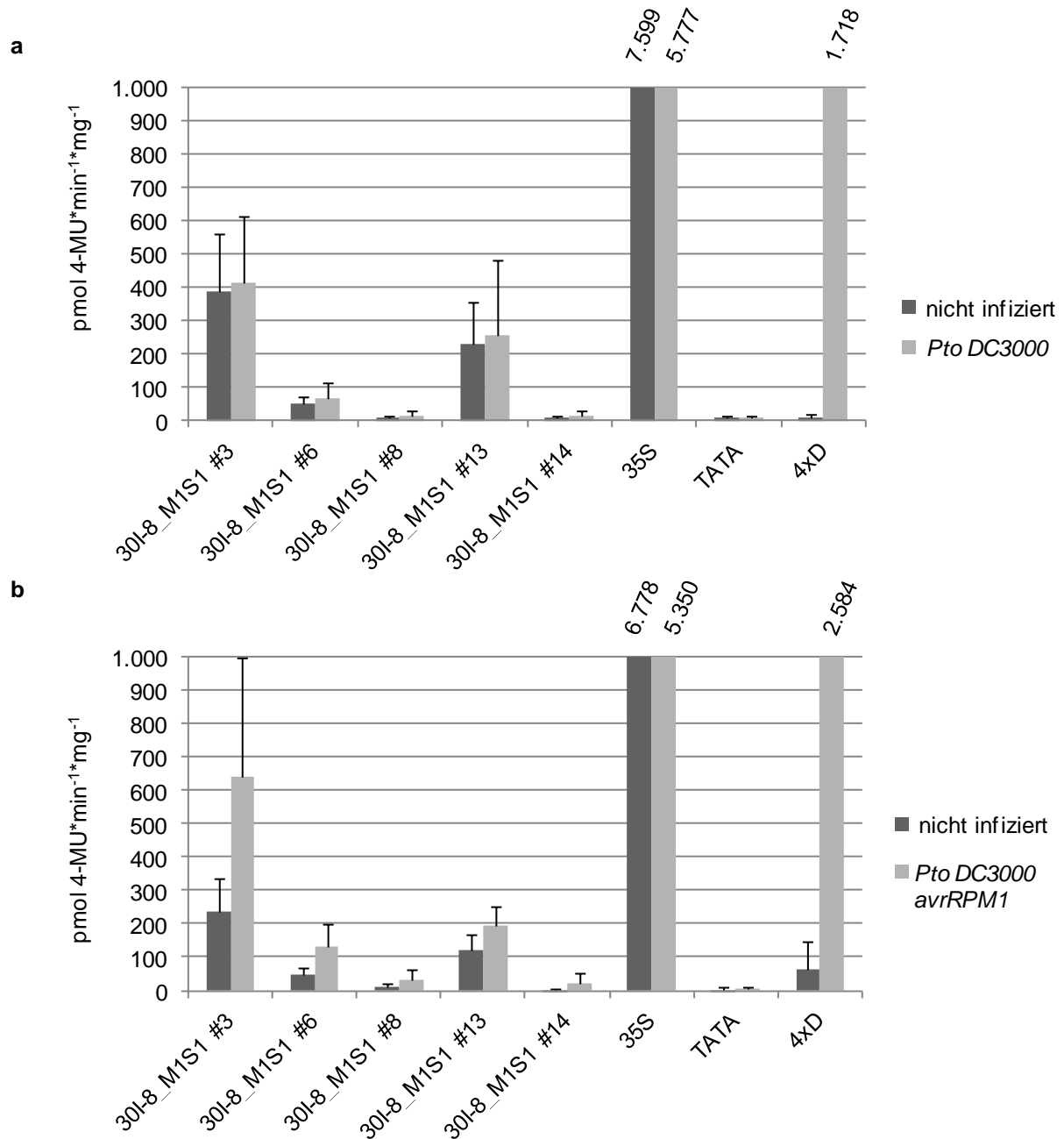


Abbildung 14: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an *Pto DC3000* infizierten bzw. nicht infizierten 30I-8_M1S1-Pflanzen

GUS-Aktivität in infizierten bzw. nicht infizierten Blättern (2 dpi). Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (a) Infektion mit *Pto DC3000* (virulent). (b) Infektion mit *Pto DC3000 avrRPM1* (avirulent).

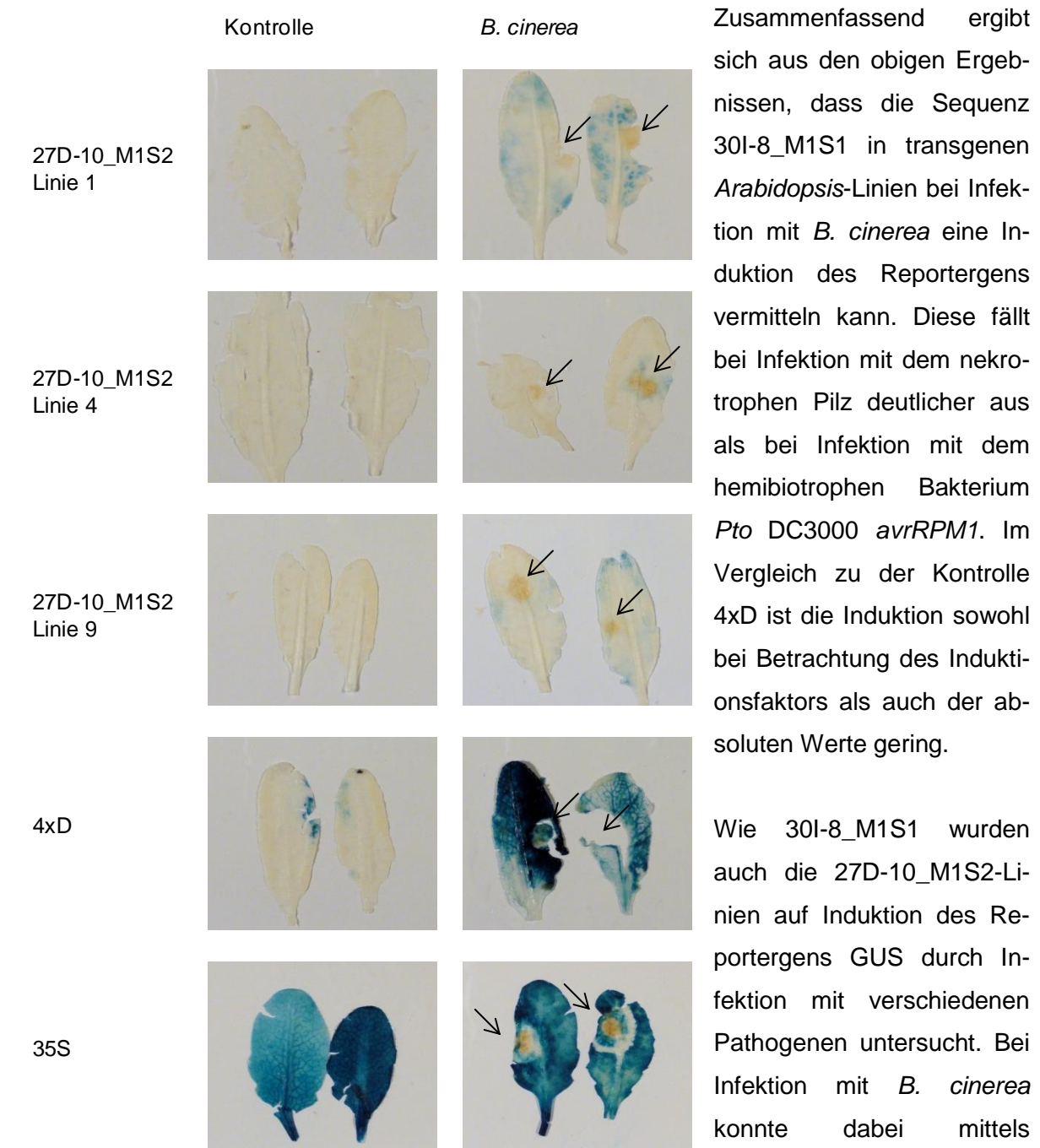


Abbildung 15: GUS-Färbungen an *B. cinerea* infizierten bzw. nicht infizierten Blättern verschiedener 27D-10_M1S2-Linien.

Zum Vergleich sind die Kontrollen 4xD bzw. 35S gezeigt. Die Pfeile markieren die Infektionsstelle (3 dpi).

Zusammenfassend ergibt sich aus den obigen Ergebnissen, dass die Sequenz 30I-8_M1S1 in transgenen *Arabidopsis*-Linien bei Infektion mit *B. cinerea* eine Induktion des Reportergens vermitteln kann. Diese fällt bei Infektion mit dem nekrotrophen Pilz deutlicher aus als bei Infektion mit dem hemibiotrophen Bakterium *Pto* DC3000 *avrRPM1*. Im Vergleich zu der Kontrolle 4xD ist die Induktion sowohl bei Betrachtung des Induktionsfaktors als auch der absoluten Werte gering.

Wie 30I-8_M1S1 wurden auch die 27D-10_M1S2-Linien auf Induktion des Reportergens GUS durch Infektion mit verschiedenen Pathogenen untersucht. Bei Infektion mit *B. cinerea* konnte dabei mittels GUS-Färbung ein reproduzierbarer Nachweis von Reportergenaktivität in den Linien 1 und 9 erbracht werden (Abbildung 15, Anhang 15).

Die beobachtete Färbung ist allerdings nur schwach, besonders im Vergleich mit den Kontrollen 35S bzw. 4xD. Die übrigen untersuchten Linien (4, 7 und 12) zeigen keine oder eine nicht reproduzierbare Färbung (Abbildung 15, Anhang 15). Zur weiteren Bestätigung der Induktion wurden daher auch in diesem Fall quantitative Messungen zur Bestimmung der Reportergenaktivität vorgenom-

men. Dabei bestätigt sich die in Linie 1 und 9 beobachtete Induktion und es wird erkennbar, dass auch Linie 4 und 7 deutlich durch *B. cinerea* Infektion induziert sind (Abbildung 16). Die an infizierten Blättern gemessenen Werte bewegen sich im Bereich von 300-600 pmol 4-MU*min⁻¹*mg⁻¹ (Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Einzelwerte in Anhang 15). Linie 12 zeigt fast gar keine GUS-Aktivität und ist dementsprechend auch nicht induziert. Die Induktionsfaktoren liegen zwischen 2,3 und 14,1. Wie auch bei 30I-8_M1S1 sind die für 27D-10_M1S2 gemessenen absoluten Werte im Vergleich zu den Kontrollen 4xD- und 35S-GUS sehr gering. 4xD erreicht im induzierten Zustand ca. 5.100 pmol 4-MU*min⁻¹*mg⁻¹. Dies entspricht einem Induktionsfaktor von 27,1.

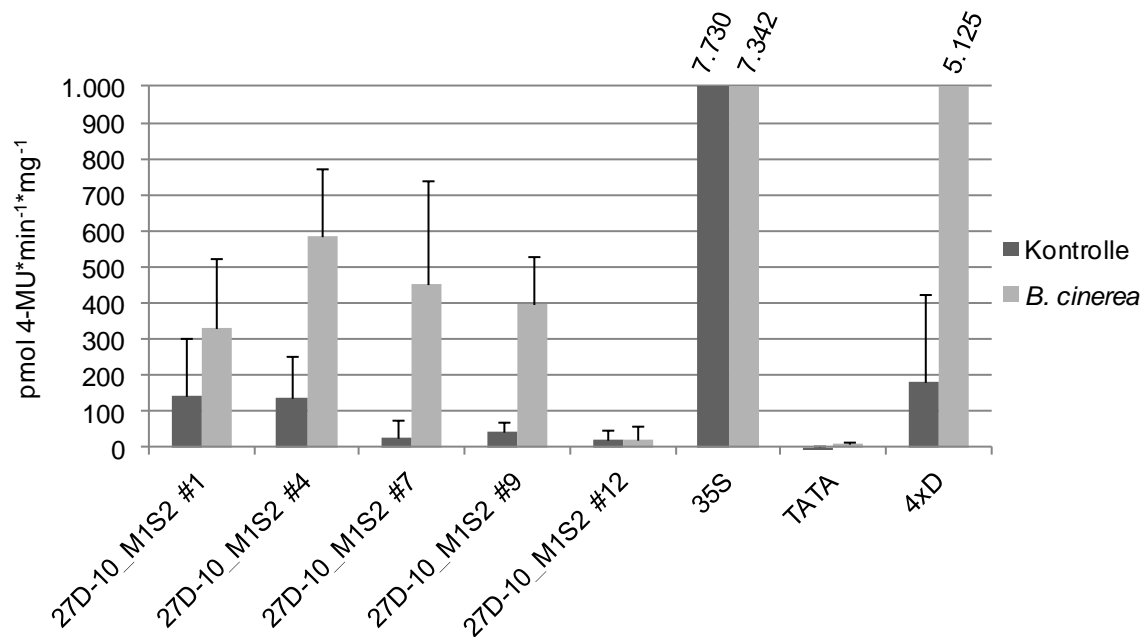


Abbildung 16: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an *B. cinerea* infizierten bzw. nicht infizierten 27D-10_M1S2-Pflanzen

GUS-Aktivität in infizierten bzw. nicht infizierten Blättern (3 dpi). Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Weitere Infektionsexperimente mit den beiden *Pto* DC3000 Stämmen (virulent/avirulent) und anschließende GUS-Färbungen zeigen, dass bei Infektion der 27D-10_M1S2-Linien keinerlei histochemisch nachweisbare GUS-Aktivität vorliegt (Anhang 16, Anhang 17). Die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität bestätigt diese Ergebnisse. Die Reporterogenaktivität bewegt sich bei den entsprechenden Linien auf einem sehr niedrigen Niveau und im Mittel aus zwei unabhängigen Experimenten ist keine erhöhte Aktivität in *Pto* DC3000 (virulent) infizierten Blättern festzustellen (Abbildung 17 a, Anhang 16). Ein ähnliches Ergebnis ist bei Verwendung der avirulenten *Pto* DC3000 *avrRPM1* Bakterien zu beobachten: Die GUS-Aktivität liegt auf einem vergleichbar niedrigen Niveau. Allerdings ist in den Linien 1 und 4 eine leichte Induktion durch die Infektion zu erkennen (Abbildung 17 b, Anhang 17). Da sich diese in kei-

ner der übrigen drei Linien zeigt, kann daraus nicht geschlossen werden, ob es sich um eine 27D-10_M1S2 vermittelte Induktion handelt. In Kombination mit den GUS-Färbungen ist somit gezeigt, dass 27D-10_M1S2 in *Arabidopsis* unter den getesteten Bedingungen nur durch *B. cinerea*, nicht aber durch *Pto* DC3000 (virulent) induzierbar ist. Eine äußerst schwache Induktion tritt eventuell mit dem avirulenten *Pto* DC3000 *avrRPM1*-Stamm auf. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei Sequenz 30I-8_M1S1 beobachtet.

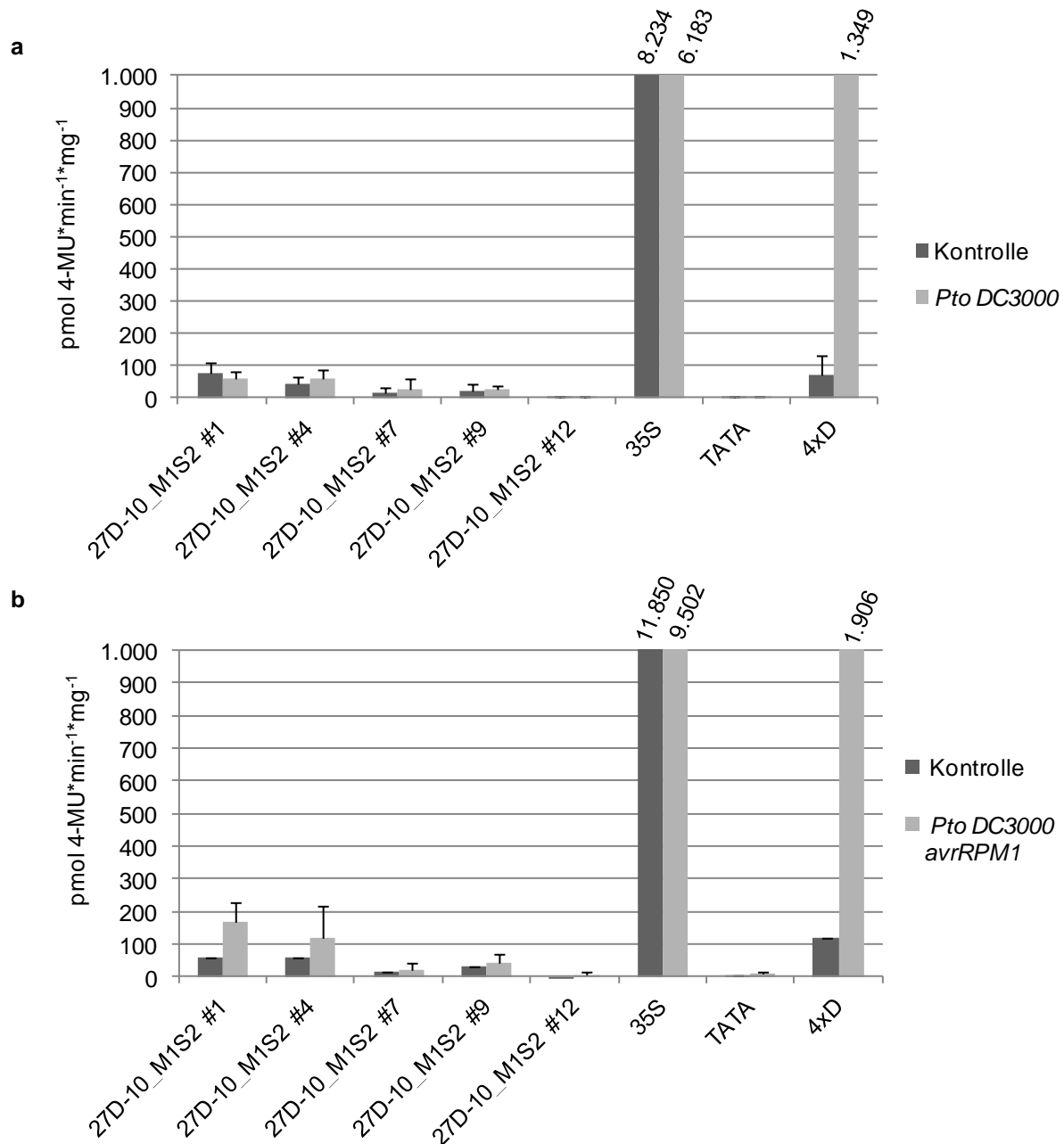


Abbildung 17: Ergebnisse der quantitativen GUS-Messungen an *Pto* DC3000 infizierten bzw. nicht infizierten 27D-10_M1S2-Pflanzen

GUS-Aktivität in infizierten bzw. nicht infizierten Blättern (2 dpi). Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (a) Infektion mit *Pto* DC3000 (virulent). (b) Infektion mit *Pto* DC3000 *avrRPM1* (avirulent).

Trotz der relativ schwachen Pathogen-Induzierbarkeit der beiden hier untersuchten synthetischen Promotoren, korrelieren die Ergebnisse gut mit der bioinformatischen Identifizierung der *cis*-Sequenzen. Bei dieser wurde der Schwerpunkt auf pilzliche Pathogene bzw. MAMPs gelegt (Koschmann *et al.*, 2012). Die beiden synthetischen Promotoren sind schwach, aber deutlich durch den Pilz *B. cinerea* induziert.

5.4. WRYK70, SPL7 und JAG sind potentielle Regulatoren der untersuchten Sequenzen

Die zuvor beschriebenen Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 stammen aus Pathogen-responsiven Promotoren aus *A. thaliana*. Beide zeigen in Petersilie-Protoplasten und transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen eine Pep25- bzw. leichte Pathogen-Responsivität. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Transkriptionsfaktoren, die an die beiden *cis*-Sequenzen binden, zu identifizieren. Zur Identifikation dieser Transkriptionsfaktoren wurden Yeast One-Hybrid-Screenings durchgeführt. Um Yeast One-Hybrid-Screenings zu testen und zu optimieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Screening durchgeführt, welches zur Identifikation von NtERF5 führte. Dieser TF bindet ein regulatorisches Element in einem anaerob induzierten Promotor. Die Ergebnisse sind publiziert und haben einen wichtigen Beitrag zur Etablierung dieser Methode geleistet (Niemeyer *et al.*, 2011).

In den Yeast One-Hybrid-Screenings mit 30I-8_M1S1- bzw. 27D-10_M1S2-Bait-Vektoren wurden verschiedene cDNA-Bibliotheken gescreent. Bei diesen Bibliotheken handelte es sich zum einen um selbst erstellte cDNA-Bibliotheken aus Gesamt-RNA aus *A. thaliana* und zum anderen um bereits existierende Bibliotheken, die ausschließlich *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktoren enthalten. Bei letzteren handelte es sich um die REGIA-Library (Paz-Ares, 2002) sowie um die bei Mitsuda *et al.* (Mitsuda *et al.*, 2010) beschriebene TF-only Library. Bis auf die Screenings mit der TF-only Library waren die Versuche jedoch nicht erfolgreich und werden hier daher nicht weiter beschrieben.

Bestimmung der Hintergrundaktivität der Bait-Konstrukte in Hefe

Für ein erfolgreiches Yeast One-Hybrid-Screening muss zunächst ein Bait-Konstrukt erstellt und in Hefezellen auf Hintergrundaktivität getestet werden. Für die hier durchgeführten Screenings wurden die unter 4.11.17 beschriebenen Konstrukte 4x30I-8_M1S1_pHis2.1 und 4x27D-10_M1S2_pHis2.1 erstellt. Sie enthalten Tetramere der Bait-Sequenz vor dem *HIS3*-Reporter gen. Alle Konstrukte wurden in Y1HGold-Hefezellen transformiert und wie unter 4.11.30 beschrieben, die nötige 3-AT-Konzentration zur Eliminierung der Hintergrund-

aktivität bestimmt. Eine Konzentration von 50 mM 3-AT ist ausreichend, um die Hintergrundaktivität der pHis2.1-Konstrukte zu inhibieren (Abbildung 18).

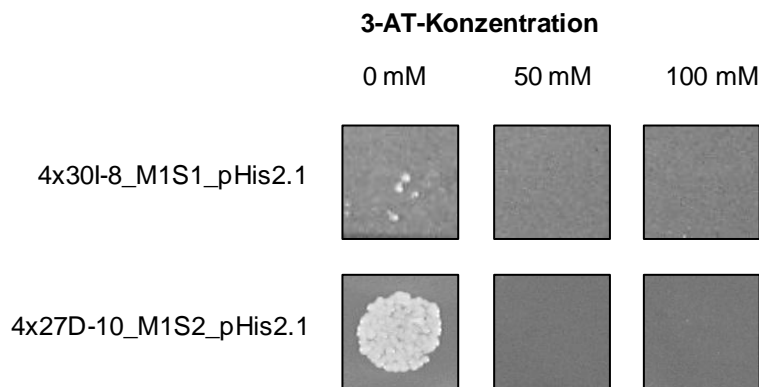


Abbildung 18: Bestimmung der 3-AT-Konzentration zur Eliminierung des Hintergrundwachstums

Die entsprechenden Bait-Konstrukte wurden im Hefestamm Y1HGold kloniert und auf SD –Trp/-His + 3-AT getestet.

Screening mit der 30I-8_M1S1-Bait-Sequenz

Für das Screening nach Transkriptionsfaktoren, die an die 30I-8_M1S1-Sequenz binden, wurde ein Y1HGold-Stamm erstellt, welcher zusätzlich zum episomalen 4x30I-8_M1S1_pHis2.1-Plasmid auch das integrative 2x30I-8_M1S1_pAbAiLIC-Konstrukt trägt. Das erste Screening wurde dabei mittels des pHis2.1-Konstruktes durchgeführt. Das zweite Bait-Konstrukt war für eine eventuelle zweite Stufe des Screenings gedacht, kam allerdings nicht zum Einsatz und ist daher hier nicht weiter beschrieben. Die Transformation des Bait-Stammes mit der TF-only Library und das anschließende Screening auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ura + 50 mM 3-AT wurde, wie in Kapitel 4.11.30 beschrieben, durchgeführt. Insgesamt wurden auf diese Weise ca. 33.000 Klone gescreent. Dies entspricht bei ca. 1.500 verschiedenen Klonen in der TF-only Library theoretisch einer 22-fachen Abdeckung. Wie unter 4.11.30 beschrieben, wurden die am schnellsten wachsenden Klone identifiziert. Dabei handelte es sich um 187 Klone, die durch wiederholtes Replika-Plattieren (4.11.30) auf Selektionsmedium mit 50 mM 3-AT verifiziert wurden. Auch nach Erhöhung der 3-AT-Konzentration auf 100 mM verblieben noch 185 Klone, die im Folgenden mittels Kolonie-PCR analysiert wurden. Abbildung 19 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Gelelektrophorese einiger Kolonie-PCRs. Bei einigen Klonen konnte kein Amplifikat erhalten werden, während die anderen fast ausschließlich PCR-Produkte der scheinbar gleichen Größe zeigen. Insgesamt sind 84 der 106 PCR-Produkte anhand der Größe nicht unterscheidbar (nicht gezeigt).

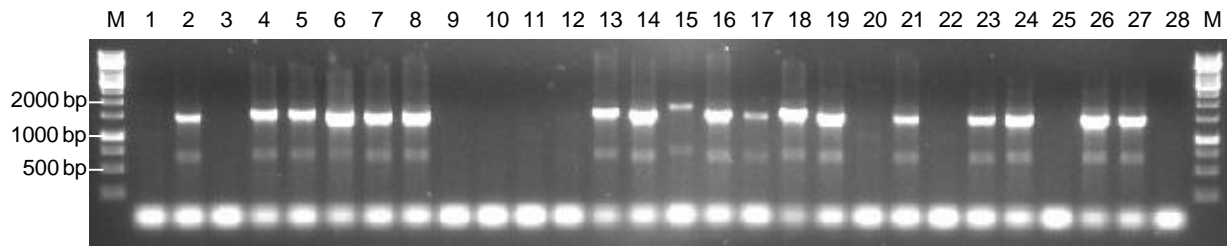


Abbildung 19: Beispielhaftes Ergebnis der Kolonie-PCR mit positiven Klonen aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 30I-8_M1S1

M: 1 kb DNA-Leiter; 1-28: Proben verschiedener Klone

Eine Stichprobe von insgesamt 34 PCR-Produkten wurde sequenziert, um den entsprechenden cDNA-Klon bestimmen zu können. Außerdem wurden aus drei weiteren Klonen, bei denen die PCR nicht erfolgreich war, die Plasmide isoliert und das Library-Plasmid in *E. coli* retransformiert. Nach Plasmidpräparation aus *E. coli* wurden diese ebenfalls zur Sequenzierung eingeschickt. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse aus 33 erfolgreichen Sequenzierungen zusammen. Insgesamt beinhalten 22 der untersuchten Klone die WRKY70-cDNA, 6 weitere Klone die WRKY53-cDNA und drei Klone die SPL7-cDNA. Letztere stammen aus der Sequenzierung der Klone, welche kein PCR-Produkt ergaben. Weiterhin tritt je einmal ABR1 bzw. SPL4 auf.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 30I-8_M1S1

AGI	Name	Anzahl
At3g56400	WRKY transcription factor 70 (WRKY70)	22
At4g23810	WRKY transcription factor 53 (WRKY53)	6
At5g18830	Squamosa promoter-binding-like protein 7 (SPL7)	3
At1g53160	Squamosa promoter-binding-like protein 4 (SPL4)	1
At5g64750	Ethylene-responsive transcription factor ABR1	1

Auf Grund des wiederholten Auftretens der Transkriptionsfaktoren WRKY70, WRKY53 und SPL7 wurde in den weiteren Analysen der Schwerpunkt auf diese drei Proteine gelegt. Der erste Schritt war hierbei, die Interaktion zwischen dem jeweiligen TF und der Bait-Sequenz zu verifizieren. Zu diesem Zweck wurde das entsprechende Library-Plasmid aus den positiven Hefeklonen isoliert und in *E. coli* retransformiert. Zur Rekonstruktion der Interaktion zwischen Bait und Prey wurde das Prey-Plasmid nochmals zusammen mit dem Bait-Konstrukt in Y1HGold-Hefezellen transformiert. Diese Klone wurden auf Selektionsmedium mit 50 mM 3-AT plattiert (analog zum Vorgehen zur Bestimmung der benötigten 3-AT-Konzentration, 4.11.30), um das Wachstum zu überprüfen.

Abbildung 20 zeigt repräsentative Ergebnisse für alle untersuchten Kombinationen aus Library-Plasmid und Bait-Konstrukt nach drei Tagen Inkubation bei 30 °C. Alle getesteten Stämme zeigen erwartungsgemäß gutes Wachstum auf Medium ohne 3-AT. Die Positivkontrolle, welche die Plasmide p53His2 und pGADRec2-53 enthält, zeigt außerdem gutes Wachstum auf Medium mit 50 bzw. 100 mM 3-AT. Die entsprechende Negativkontrolle mit dem leeren pHis2.1-Vektor und pGADRec2-53 wächst nur auf Selektionsmedium ohne 3-AT. Bei Verwendung des WRKY70-Plasmids zusammen mit dem 30I-8_M1S1-Bait-Konstrukt tritt Wachstum auf Medium mit 50 mM 3-AT auf, bei 100 mM 3-AT ist kaum Wachstum zu beobachten. WRKY53 vermittelt auf 50 und 100 mM 3-AT keinerlei Wachstum mit dem Bait-Konstrukt. Für SPL7 ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei WRKY70. Der entsprechende Hefestamm mit dem 30I-8_M1S1-Bait wächst auf Selektionsmedium mit 50 und 100 mM 3-AT, wobei das Wachstum bei 100 mM 3-AT deutlich schwächer ausfällt.

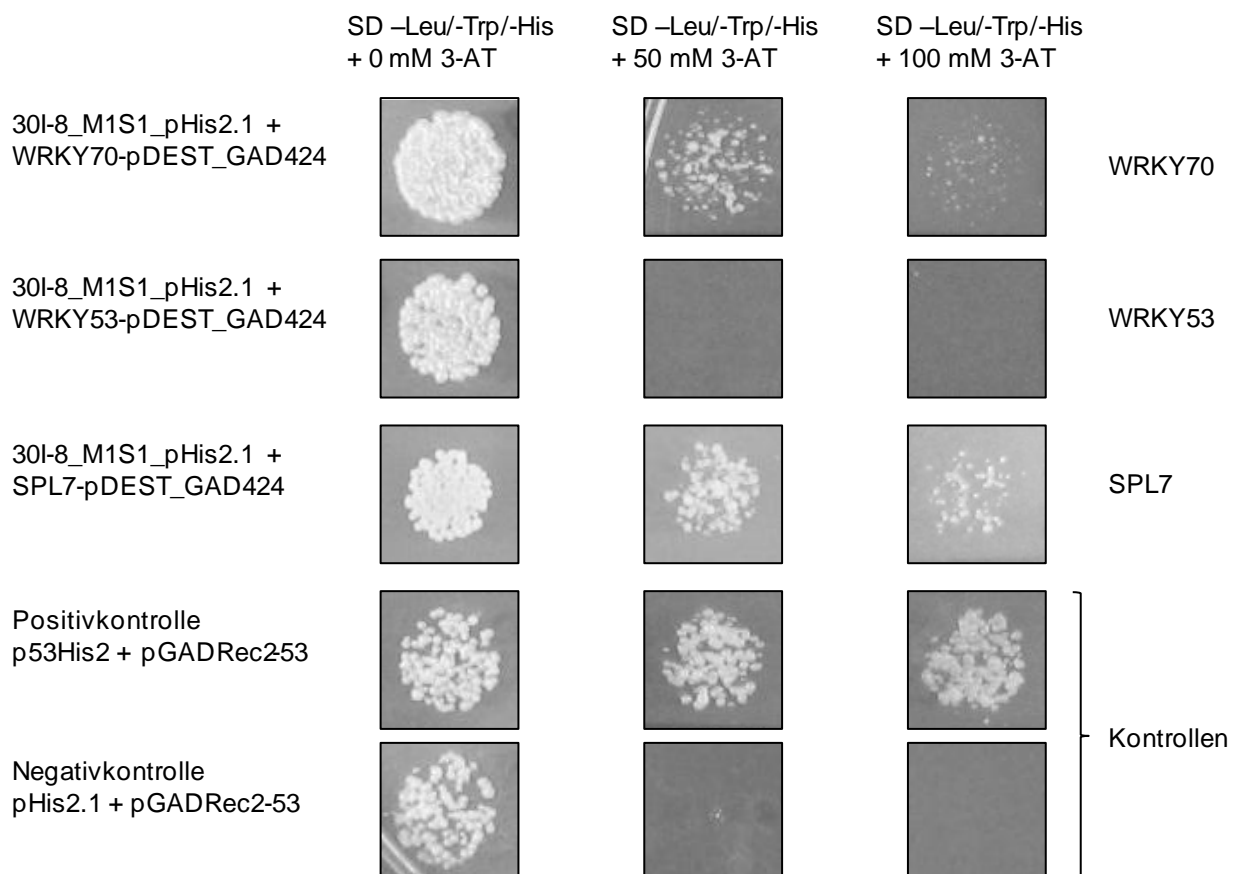


Abbildung 20: Reproduktion der Interaktion zwischen 30I-8_M1S1 und den mittels Yeast One-Hybrid identifizierten TF

Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Stämme auf Selektionsmedium mit steigendem 3-AT-Gehalt nach drei Tagen Inkubation.

Zusammenfassend sind also nur die Interaktionen zwischen WRKY70 bzw. SPL7 und 30I-8_M1S1 reproduzierbar. Bei WRKY53 ist dies nicht der Fall. Auf Grund der hier gezeigt-

ten Ergebnisse wurde entschieden nur SPL7 und WRKY70 für weitere Analysen zu verwenden. WRKY53 wurde nicht weiter bearbeitet, da es sich scheinbar um einen falsch-positiven Klon handelt, welcher unter Selektionsbedingungen keine reproduzierbare Reportergenaktivität auslösen kann.

Screening mit der 27D-10_M1S2-Bait-Sequenz

Analog zu 30I-8_M1S1 wurde auch ein Screening mit 27D-10_M1S2_pHis2.1 (in Y1HGold) durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 414.000 Klone gescreent (>270-fache Abdeckung), wobei auf den Selektionsplatten sehr viele kleine Kolonien entstanden. Von diesen wurden 49 Klone ausgewählt, welche deutlich schneller wuchsen als der Rest der Kolonien. Nach zwei Selektionsrunden auf SD -Leu/-Trp/-His + 50 mM 3-AT verblieben 34 Kolonien für die weitere Analyse. Mit diesen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, die fast ausschließlich PCR-Produkte gleicher Größe ergab (Abbildung 21). 20 dieser PCR-Produkte, welche alle auftretenden Größen abdeckten, wurden sequenziert. Von 20 untersuchten Klonen enthalten 13 den *Arabidopsis*-TF JAG (Tabelle 3). Alle weiteren TF treten nur einzeln auf und wurden daher nicht in die nachfolgenden Untersuchungen aufgenommen.

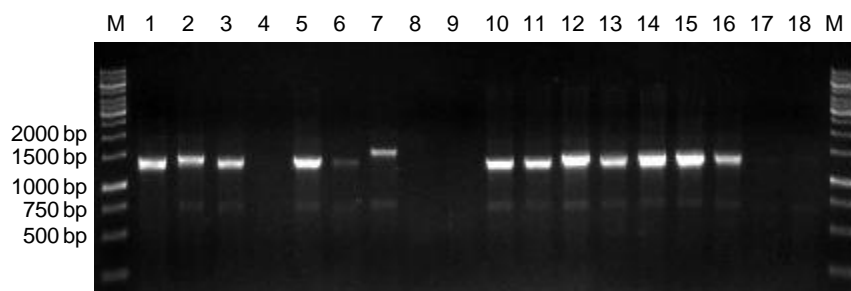


Abbildung 21: Beispielhaftes Ergebnis der Kolonie-PCR mit positiven Klonen aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 27D-10_M1S2

M: 1 kb DNA-Leiter; 1-18: Proben verschiedener Klone

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Yeast One-Hybrid-Screening mit 27D-10_M1S2

AGI	Name/Beschreibung	Anzahl
At1g68480	JAG	13
At1g66420	<i>Arabidopsis</i> NAC domain containing protein 21 (NAC21)	1
At3g19580	Zinc-finger protein 2 (ZF2)	1
At5g05120	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	1
At1g33760	DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor family	1
At2g37590	DNA binding with one finger 2.4 (DOF2.4)	1
At5g63790	NAC domain containing protein 102 (NAC102)	1

Wie zuvor bei 30I-8_M1S1 sollte auch hier die Interaktion zwischen JAG und 27D-10_M1S2 in Hefezellen reproduziert werden, indem Bait- und Prey-Plasmid erneut in Y1HGold-Zellen transformiert wurden. Die so erhaltenen rekonstruierten Klone wurden wiederum auf Selektionsmedium (SD –Leu/-Trp/-His) mit verschiedenen 3-AT-Konzentrationen auf ihr Wachstum untersucht. Überraschenderweise ist zwar bei der Positivkontrolle (p53His2 und pGADRec2-53 in Y1HGold) und bei der Negativkontrolle (pHis2.1 und pGADRec2-53 in Y1HGold) das erwartete Ergebnis zu beobachten, jedoch tritt bei Kombination von JAG und 27D-10_M1S2 unter Selektion mit 3-AT kein Wachstum auf (Abbildung 22). Auch eine längere Inkubation der Selektionsplatte bei 30 °C führte nicht zum Wachstum der entsprechenden Zellen (nicht gezeigt). Trotz der fehlgeschlagenen Reproduktion der Interaktion zwischen JAG und 27D-10_M1S2 in Hefe wurde entschieden, weitere Analysen durchzuführen. Der Grund hierfür war die hohe Abundanz von JAG unter den positiven Klonen.

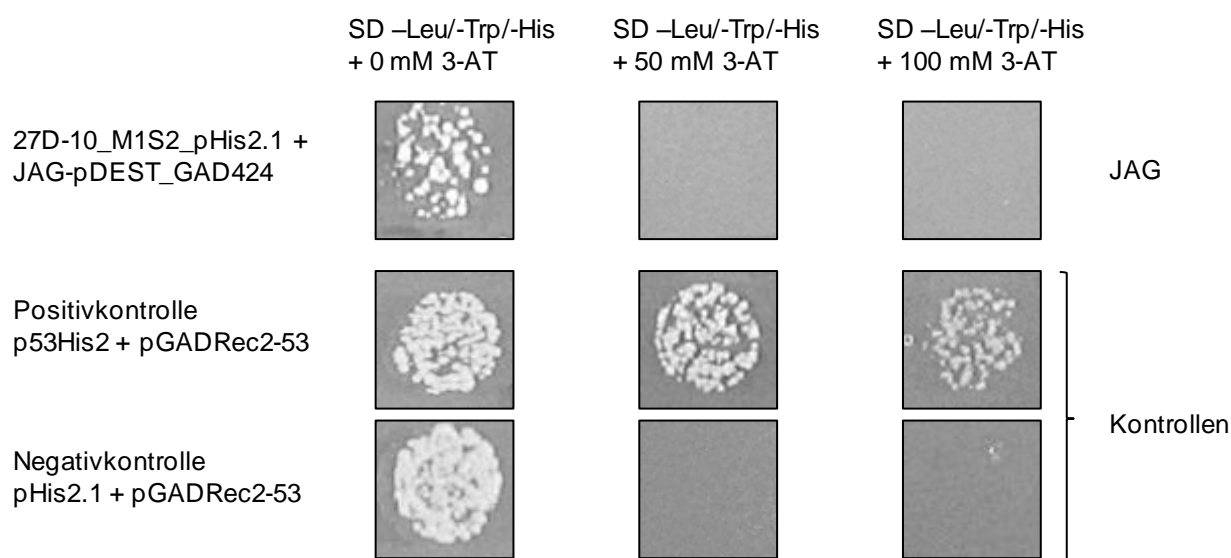


Abbildung 22: Reproduktion der Interaktion zwischen 27D-10_M1S2 und JAG

Gezeigt ist das Wachstum der entsprechenden Stämme auf Selektionsmedium mit steigendem 3-AT-Gehalt nach drei Tagen Inkubation

5.5. Untersuchungen zur Transaktivierbarkeit von 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 durch ihre potentiellen Regulatoren

Mittels Yeast One-Hybrid-Screenings wurden die *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktoren WRKY70, SPL7 und JAG als potentielle Regulatoren der Gruppe 27-Sequenzen 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 identifiziert (5.4). Um zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse aus dem Hefe-System auch in ein heterologes (Petersilie) bzw. in das homologe System (*Arabidopsis*) übertragen lassen, wurden Protoplasten-Transfektionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Transkriptionsfaktoren, wie unter 4.11.18 beschrieben, kloniert und in einen geeigneten T-DNA-Expressionsvektor subkloniert (4.11.20). Diese Expressionskonstrukte wurden, wie unter 4.11.32 bzw. 4.11.34 beschrieben, zusammen mit dem jeweils zu untersuchenden Reporterkonstrukt in Petersilie bzw. *Arabidopsis*-Protoplasten transfiziert und die Reporterogenaktivität bestimmt. Die Experimente mit *Arabidopsis*-Protoplasten wurden z.T. von Felix Umrath im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt (Umrath, 2012).

WRKY70 aktiviert 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2

Die Kotransfektion von WRKY70 zusammen mit dem 30I-8_M1S1-Reporterkonstrukt bewirkt in Petersilie-Protoplasten im Vergleich zur Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor eine deutliche Steigerung der Reporterogenaktivität (Abbildung 23 a). Im Mittel über alle in Petersilie-Protoplasten unabhängig durchgeführten Experimente beläuft sich diese Steigerung auf das ca. 10-fache (Die Einzelwerte dieser und aller folgenden Messungen finden sich in Anhang 18). Im Vergleich mit dem leeren Reportervektor pBT10GUS/LUC fällt dabei auf, dass auch bei diesem eine Steigerung der Reporterogenaktivität messbar ist. Diese liegt im Bereich von ca. vierfach im Bezug auf die Aktivität bei Kotransfektion des leeren Expressionsvektors. Da die absolute Reporterogenaktivität im Vergleich zu 30I-8_M1S1 allerdings gering ist, wird dieser Effekt vernachlässigt.

Bei Durchführung der Kotransfektion in *Arabidopsis*-Protoplasten bestätigt sich das Ergebnis aus dem heterologen System: Auch hier bewirkt die WRKY70-Überexpression eine deutliche Steigerung der Reporterogenaktivität (ca. vierfach, Abbildung 23 b, Anhang 19). Im Gegensatz zum Petersilie-Protoplasten-System kommt es bei Verwendung des leeren Reportervektors (pBT10GUS) in *Arabidopsis* nicht zu der oben beschriebenen Steigerung der Reporterogenaktivität. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus beiden Protoplasten-Systemen scheint somit eine Transaktivierung von 30I-8_M1S1 durch WRKY70 vorzuliegen.

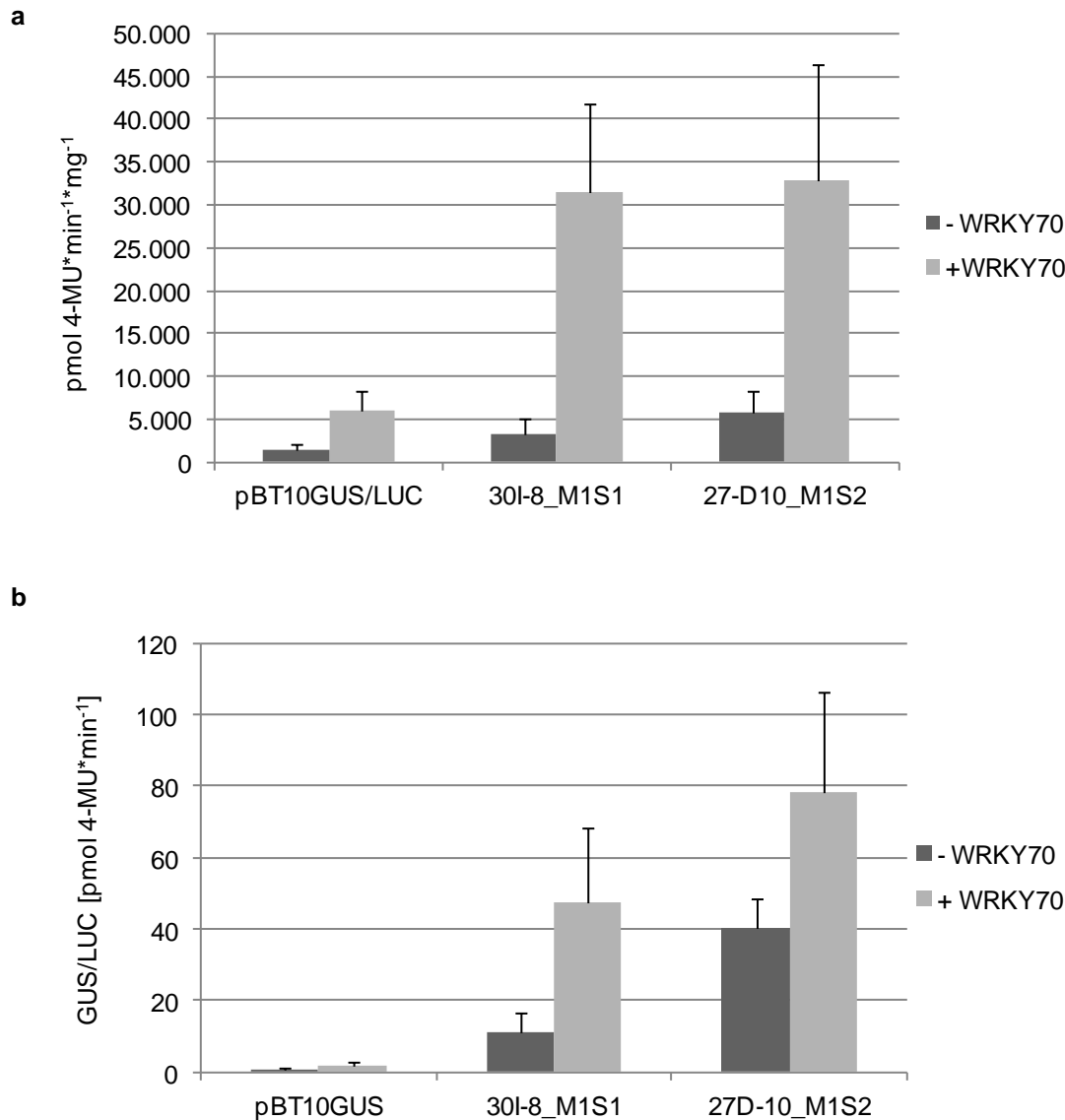


Abbildung 23: Effekt der WRKY70-Überexpression auf 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2

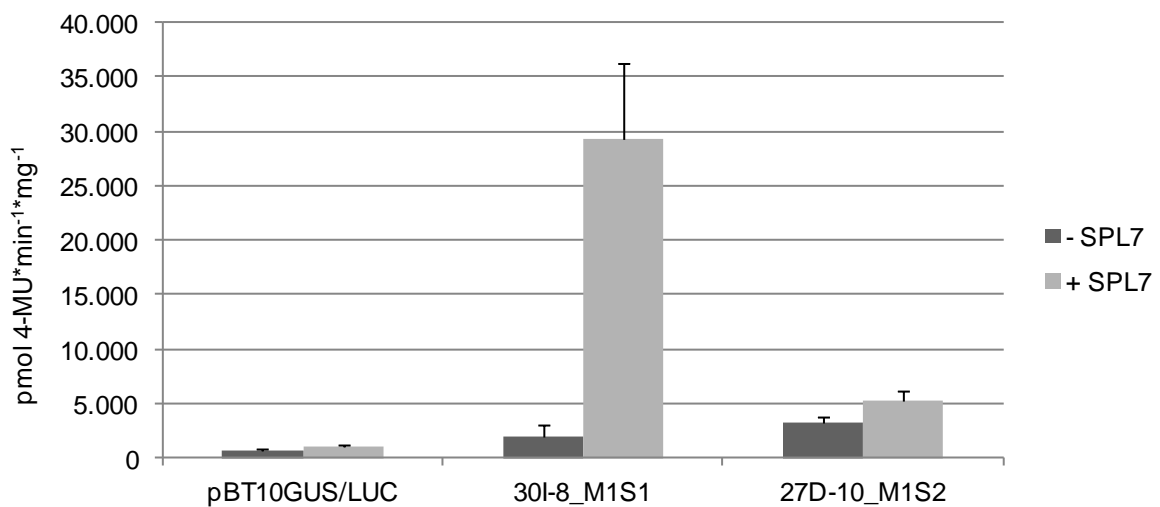
Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit entsprechendem Expressionsvektor in die Protoplasten transfiziert. -WRKY70: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +WRKY70: Kotransfektion mit WRKY70-Expressionsvektor. (a) Ergebnisse aus Petersilie-Protoplasten. (b) Ergebnisse aus *Arabidopsis*-Protoplasten.

WRKY70 wurde im Yeast One-Hybrid-Screening mit 30I-8_M1S1 als Bait-Sequenz identifiziert. Dennoch wurde auch der Einfluss von WRKY70-Überexpression auf die Aktivität der Sequenz 27D-10_M1S2 untersucht. Der Grund dafür ist die große Ähnlichkeit der beiden Sequenzen im Kernbereich (Abbildung 9). Sowohl in Protoplasten aus Petersilie als auch aus *Arabidopsis* kommt es bei WRKY70-Überexpression zu einer Steigerung der Reporter-genaktivität (Abbildung 23) um den Faktor 6 (Petersilie) bzw. Faktor 2 (*Arabidopsis*). Mit diesen Experimenten konnte also gezeigt werden, dass WRKY70 zur Transaktivierung der beiden Gruppe 27-Sequenzen 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 in der Lage ist.

SPL7 ist ein Aktivator von 30I-8_M1S1 aber nicht von 27D-10_M1S2

Der Transkriptionsfaktor SPL7 wurde mit der Sequenz 30I-8_M1S1 als Bait identifiziert. Analog zum Vorgehen mit WRKY70 wurde der Einfluss von SPL7-Überexpression auf 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 in Petersilie- und *Arabidopsis*-Protoplasten untersucht. Es ist in beiden Systemen erkennbar, dass es nur in Verbindung mit 30I-8_M1S1 zu einer deutlichen Aktivierung des Reportergens kommt (Abbildung 24, Anhang 20 und Anhang 21). 27D-10_M1S2 scheint durch SPL7 nicht aktiviert zu werden. Die Ähnlichkeit der beiden Gruppe 27-Sequenzen scheint in diesem Fall also keine Rolle zu spielen.

a



b

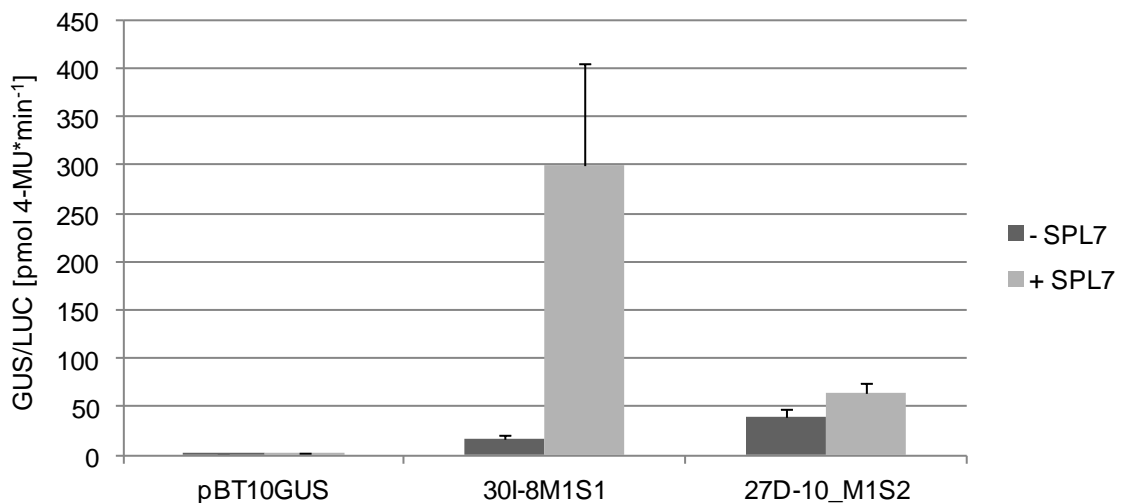


Abbildung 24: Effekt der SPL7-Überexpression auf 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2

Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit entsprechendem Expressionsvektor in die Protoplasten transfiziert. -SPL7: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +SPL7: Kotransfektion mit SPL7-Expressionsvektor. (a) Ergebnisse aus Petersilie-Protoplasten. (b) Ergebnisse aus *Arabidopsis*-Protoplasten.

JAG ist kein Aktivator der Gruppe 27-Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2

Der *Arabidopsis*-Transkriptionsfaktor JAG wurde in einem Yeast One-Hybrid-Screening mit 27D-10_M1S2 als Bait identifiziert. Auch mit diesem Transkriptionsfaktor wurde in beiden Protoplasten-Systemen der Einfluss der transienten JAG-Überexpression auf die durch 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 vermittelte Reporterogenaktivität untersucht. Abbildung 25 zeigt die entsprechenden Ergebnisse (Einzelwerte befinden sich in Anhang 22 und Anhang 23). Weder 27D-10_M1S2 noch 30I-8_M1S1 werden durch JAG-Überexpression aktiviert. Die Ergebnisse aus Petersilie-Protoplasten zeigen zwar einen leichten Anstieg der Reporterogenaktivität, dieser liegt allerdings relativ gesehen im gleichen Bereich wie beim leeren Reportervektor (pBT10GUS/LUC) und scheint daher nicht spezifisch zu sein. Auch die absoluten Werte sind im Vergleich zu den bei WRKY70- bzw. SPL7-Überexpression gemessenen deutlich niedriger. Der Anstieg beruht also vermutlich auf dem gleichen Effekt wie beim leeren Vektor. In Verbindung mit den Ergebnissen aus *Arabidopsis*-Protoplasten ist daher davon auszugehen, dass JAG kein Aktivator der getesteten Sequenzen ist. Auch eine Funktion als Repressor erscheint auf Grundlage der Daten aus den *Arabidopsis*-Protoplasten unwahrscheinlich, da die basale Reporterogenaktivität in *Arabidopsis* durch JAG-Überexpression nicht verringert wird.

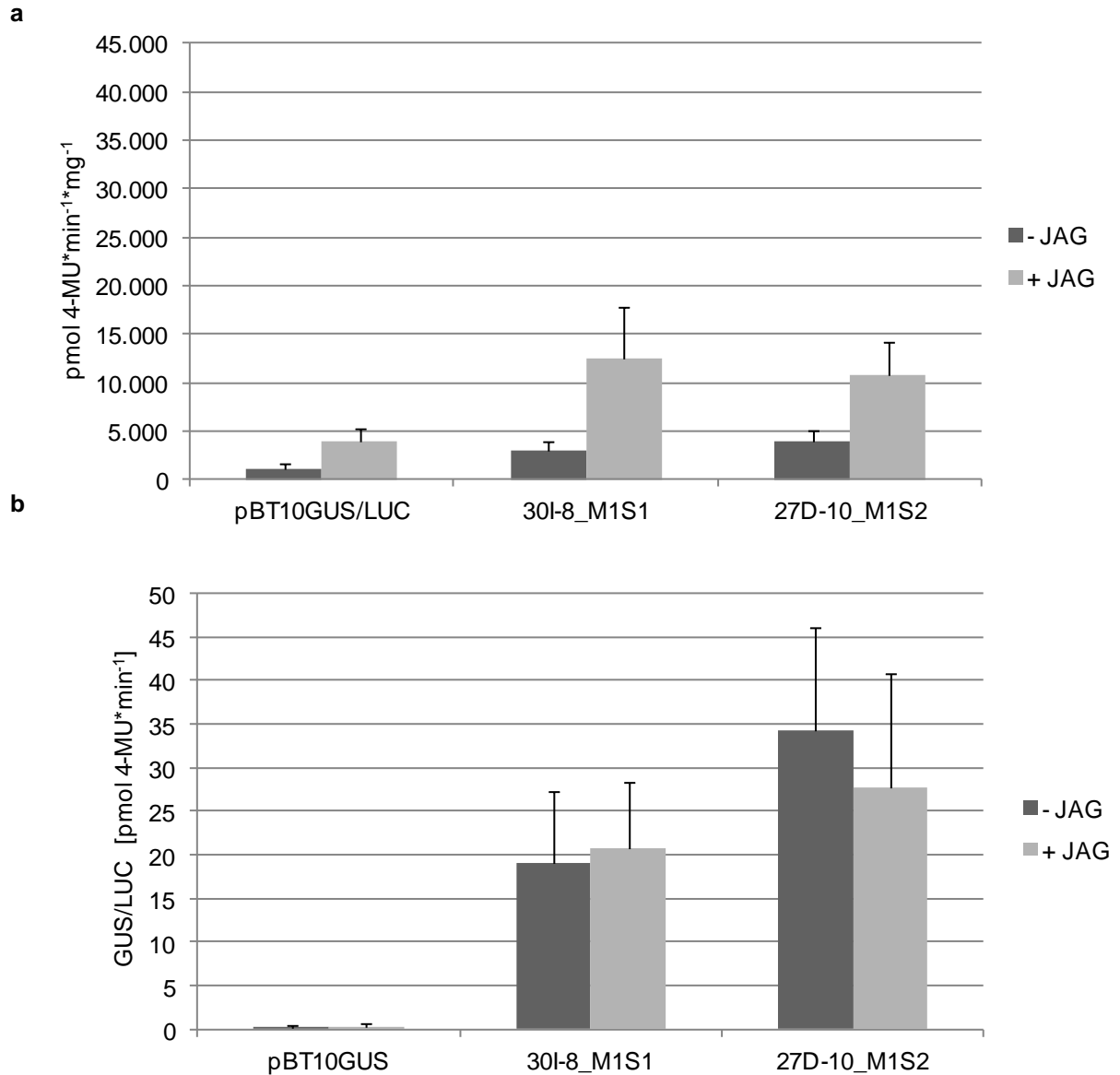


Abbildung 25: Effekt der JAG-Überexpression auf 30l-8_M1S1 und 27D-10_M1S2

Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit entsprechendem Expressionsvektor in die Protoplasten transfiziert. -JAG: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +JAG: Kotransfektion mit JAG-Expressionsvektor. (a) Ergebnisse aus Petersilie-Protoplasten. (b) Ergebnisse aus *Arabidopsis*-Protoplasten.

5.6. Die potentielle SPL7-TFBS in der 30I-8_M1S1-Sequenz ist klonierungsbedingt

Aus den unter 5.5 beschriebenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass SPL7 bei Expression in *Arabidopsis*- sowie Petersilie-Protoplasten zu einer deutlichen Aktivierung von 30I-8_M1S1, jedoch nicht zur Aktivierung von 27D-10_M1S2 führt. Dies macht eine Bindung von SPL7 an die in beiden Sequenzen sehr ähnliche Kernsequenz unwahrscheinlich. Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass SPL7 *in vitro* an GTAC-Motive im Promotor der an der Kupfer-Homöostase beteiligten *miR398c* aus *Arabidopsis* bindet und dass in *sp17*-Knockout-Pflanzen bei Kupfermangel keine Hochregulation von *mir398b* und *miR938c* stattfindet (Yamasaki *et al.*, 2009). Daraus leitete sich die Arbeitshypothese ab, dass SPL7 auch in der 30I-8_M1S1-Sequenz an die GTAC-Sequenz bindet, welche zur Hälfte aus der bioinformatisch identifizierten Sequenz und zur anderen Hälfte aus dem für die Klonierung verwendeten Linker stammt (Abbildung 26 a). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden ausgewählte Mutationen der 30I-8_M1S1-Sequenz für Kotransfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten verwendet (Abbildung 26 a).

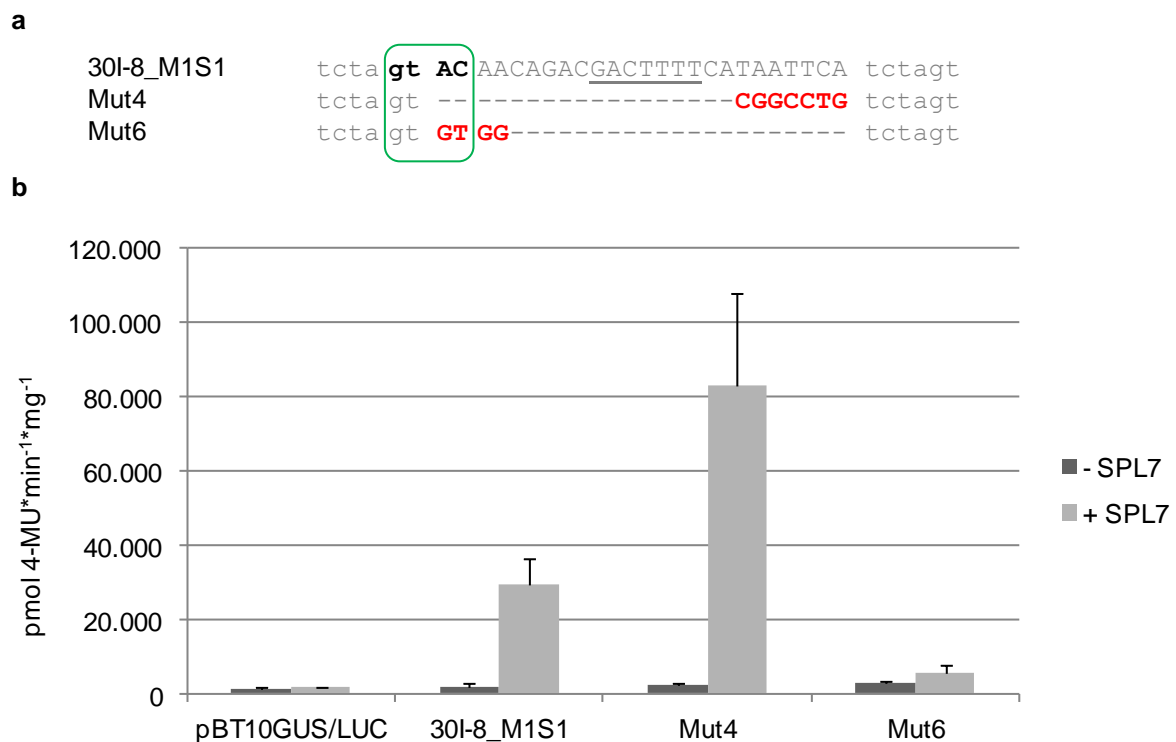


Abbildung 26: Aktivierbarkeit der Mutationen 4 und 6 von 30I-8_M1S1 durch SPL7-Überexpression in Petersilie-Protoplasten

(a) Die potentielle SPL7-Bindungsstelle ist hervorgehoben, die modifizierten Nukleotide sind rot markiert. Die potentielle Kernsequenz der Motivgruppe 27 ist unterstrichen. Die Linkersequenzen sind ebenfalls gezeigt (Kleinbuchstaben) (b) Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten. -SPL7: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +SPL7: Kotransfektion mit SPL7-Expressionsvektor.

Mutation 4 liegt relativ zur potentiellen GTAC-Bindungsstelle im 3' Bereich der 30I-8_M1S1-Sequenz. Diese Mutation verändert somit weder die GTAC-Site noch den direkt flankierenden Bereich. Mutation 6 hingegen betrifft vier Nukleotide im 5' Bereich von 30I-8_M1S1. Dadurch wird die GTAC-Sequenz zu GTGT modifiziert (Abbildung 26 a). Die als Tetramere in pBT10GUS/LUC klonierten Mutationen wurden unter Mithilfe von Marlies Becker zusammen mit SPL7 in *Petersilie*-Protoplasten transfiziert und die Reporterogenaktivität im Vergleich zur Transfektion mit leerem Expressionsvektor bestimmt. Als Kontrolle dienten die unveränderte 30I-8_M1S1-Sequenz sowie pBT10GUS/LUC. Wie in Abbildung 26 b erkennbar, ist Mutation 4 nach wie vor durch SPL7-Expression aktivierbar, während es bei Mutation 6 zu einem vollständigen Verlust der Induktion kommt (alle Messwerte befinden sich in Anhang 20). Die in der entsprechenden Mutation veränderten Nukleotide scheinen also essentiell für die Aktivierung zu sein. Diese Beobachtung deckt sich mit der Hypothese, dass die GTAC-Sequenz die SPL7-Bindungsstelle in 30I-8_M1S1 darstellt. Die in der Gruppe 27 identifizierte Kernsequenz spielt somit für die SPL7 vermittelte Transaktivierung offensichtlich keine Rolle. Die beobachtete Aktivierung ist wahrscheinlich nur auf die durch die Klonierung entstehende SBP-Site (GTAC) zurückzuführen. Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit einem *in vitro* Bindungsexperiment untermauert (vgl. Abschnitt 5.9).

5.7. Mutationsanalysen zur Identifikation potentieller WRKY70-TFBS in 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2

Sowohl 30I-8_M1S1 also auch 27D-10_M1S2 werden in beiden Protoplasten-Systemen durch Überexpression des Transkriptionsfaktors WRKY70 induziert (5.5). Für WRKY-Transkriptionsfaktoren ist eine invariante, minimale Kernsequenz TTGACC/T beschrieben, von der es nur wenige Ausnahmen gibt (Rushton, 1996; Eulgem *et al.*, 2000; Ciolkowski *et al.*, 2008). Beide hier untersuchten Sequenzen enthalten diese und auch die verkürzte Kernsequenz TGAC nicht (Abbildung 4). Es wurde daher mittels Mutationsanalysen untersucht, welche Nukleotide in 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 für die Transaktivierbarkeit durch WRKY70 benötigt werden. Dies sollte es erlauben, die WRKY70-TFBS zu identifizieren.

30I-8_M1S1 enthält eine WRKY70-TFBS

Um den für die Aktivierung durch WRKY70 notwendigen Sequenzbereich einzuschränken, wurden analog zum Vorgehen bei SPL7 zunächst Kotransfektionsexperimente mit Petersilie-Protoplasten durchgeführt. Dabei wurden die bereits vorhandenen Mutationen von 30I-8_M1S1 bzw. 27D-10_M1S2 auf ihre Induzierbarkeit durch WRKY70-Überexpression untersucht.

Für 30I-8_M1S1 wurden hierzu die Mutationen 6 bis 10 ausgewählt, welche den Pep25-responsiven Bereich in Schritten zu je vier Nukleotiden abdecken. Zusätzlich wurden die Mutationen 3, 4 und 5, welche die potentielle Kernsequenz GACTTTT sowie den 3' Bereich der 30I-8_M1S1-Sequenz betreffen, untersucht (Abbildung 27 a). Die Analysen in Petersilie-Protoplasten zeigen, dass die Mutationen 4 und 6, welche am 3' bzw. 5' Ende der Sequenz liegen, keinen negativen Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch WRKY70 haben. Weiterhin zeigt sich im Vergleich zur Originalsequenz bei den Mutationen 3, 7 und 10 eine abgeschwächte Induktion. Die Mutationen 5, 8 und 9 sind hingegen fast gar nicht mehr aktivierbar. Der deutlichste Effekt tritt hier bei der auf die GACTTTT-Sequenz abzielenden Mutation 5 auf (Abbildung 27 b, Anhang 18).

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich der Bereich, der für die WRKY70 vermittelte Aktivierung essentiell ist, auf die Mutationen 8, 9 und 5 einschränken. Weiterhin ist ein quantitativer Einfluss der vier Thymin-Reste, die durch Mutation 3, 5 sowie Mutation 10 betroffen sind, anzunehmen. Die für die WRKY70-vermittelte Induzierbarkeit essentielle Sequenz ist somit auf ACGACTTTT eingegrenzt (Abbildung 27 a, grüner Rahmen). Dies führte zu der Arbeitshypo-

these, dass die WRKY70-TFBS eine modifizierte W-Box mit der Kernsequenz CGAC anstelle der klassischen TGAC-Kernsequenz ist. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden vier weitere Mutationen (Mutation 11-14) entworfen (Abbildung 28 a).

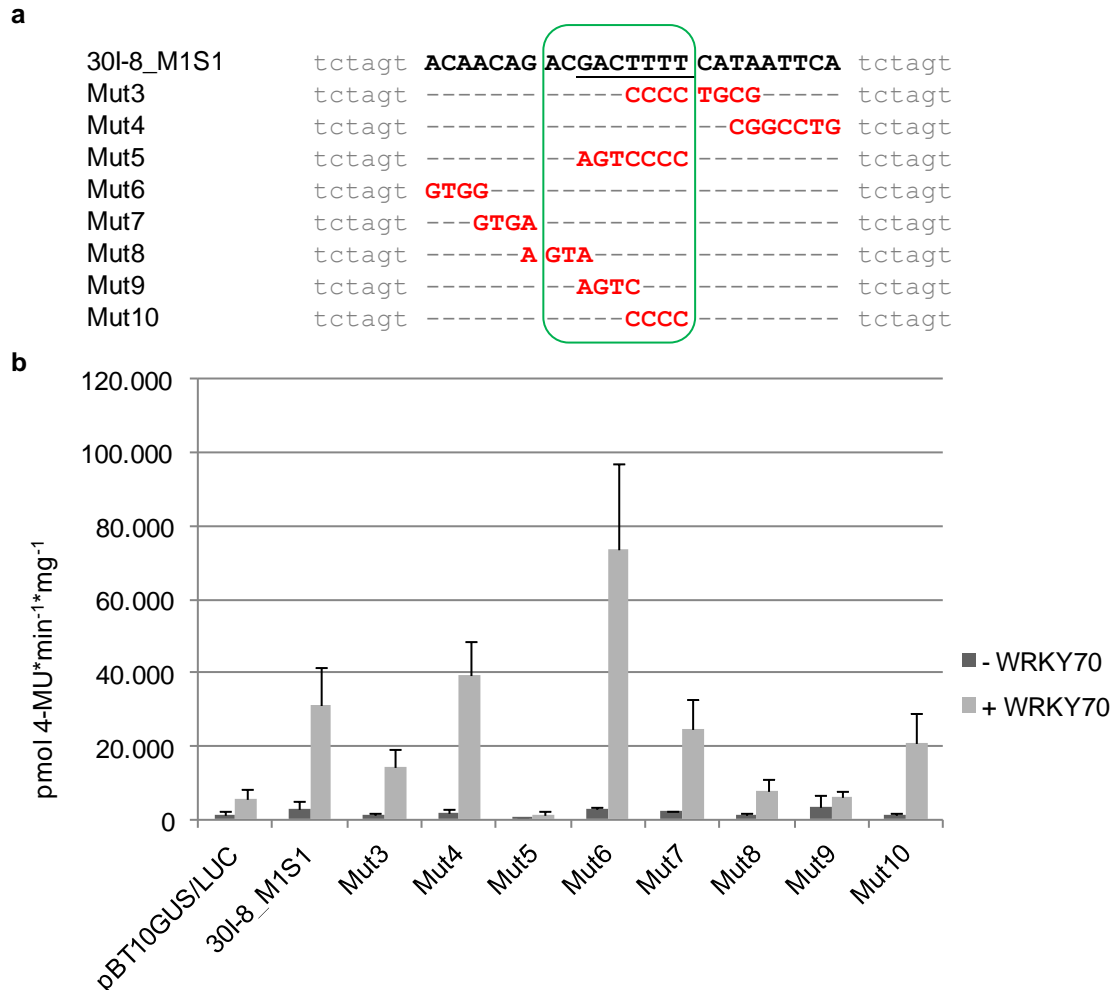


Abbildung 27: Aktivierbarkeit der Mutationen 3-10 von 30l-8_M1S1 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten

(a) Die in den Mutationen 3 bis 10 modifizierten Nukleotide sind rot markiert, der für die Transaktivierung durch WRKY70 essentielle Bereich ist eingerahmt. Die potentielle Kernsequenz ist unterstrichen. (b) Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten. -WRKY70: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +WRKY70: Kotransfektion mit WRKY70-Expressionsvektor.

Mutation 11 betrifft die zwei Nukleotide vor der potentiellen CGAC-Kernsequenz. Entsprechend der Hypothese sollte diese nach wie vor eine Aktivierung durch WRKY70 erlauben. Die Mutationen 12 und 13 betreffen je zwei Nukleotide der CGAC-Sequenz und sollten die TFBS daher zerstören. Mit Mutation 14 wird die CGAC-Sequenz durch einen einzelnen Nukleotidaustausch in die klassische TGAC-Kernsequenz der W-Box umgewandelt (Abbildung 28 a). Alle vier neuen Mutationen wurden, wie die vorherigen Mutationen, mit Hilfe von Marlies Becker in Petersilie-Protoplasten auf ihre WRKY70-Aktivierbarkeit untersucht.

a

30I-8_M1S1	tctagt	<u>ACAACAGA</u>	<u>CGAC</u>	<u>TTTTCATAATTCA</u>	tctagt
Mut10	tctagt	-----	----	CCCC	tctagt
Mut11	tctagt	-----	AC	-----	tctagt
Mut12	tctagt	-----	TA	-----	tctagt
Mut13	tctagt	-----	GT	-----	tctagt
Mut14	tctagt	-----	T	-----	tctagt

b

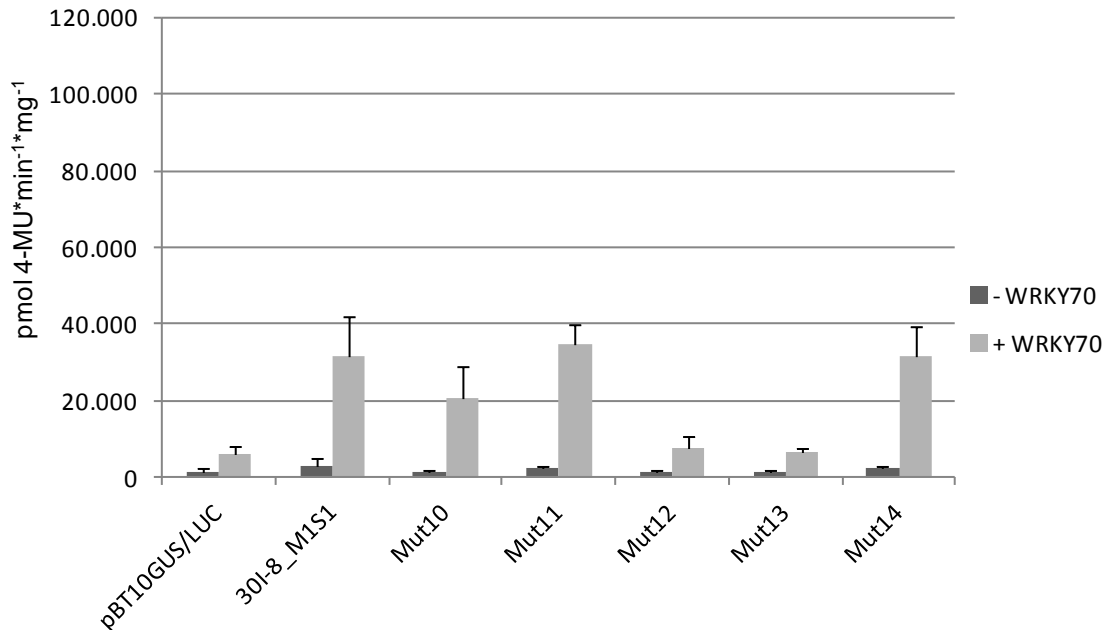


Abbildung 28: Aktivierbarkeit der Mutationen 10-14 von 30I-8_M1S1 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten

(a) Die in den Mutationen 10 bis 14 modifizierten Nukleotide sind rot markiert, der weiter eingegrenzte, für die Transaktivierung durch WRKY70 essentielle Bereich ist eingerahmt. Die potentielle Kernsequenz der Motivgruppe 27 ist unterstrichen. (b) Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten. -WRKY70: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +WRKY70: Kotransfektion mit WRKY70-Expressionsvektor

Wie in Abbildung 28 b gezeigt, sind die Mutationen 11 und 14 durch WRKY70-Überexpression induziert. Mutationen 12 und 13 zeigen dagegen keine Induktion, die über der Hintergrundaktivität des leeren pBT10GUS/LUC-Vektors liegt (alle Messwerte in Anhang 18). Daraus folgt, dass die beiden Nukleotide unmittelbar vor der CGAC-Site für die Aktivierbarkeit verzichtbar bzw. austauschbar sind. Weiterhin ist die CGAC-Site selbst für die Induzierbarkeit notwendig, da die beiden Mutationen 12 und 13 diese nicht mehr enthalten. Mutation 14, die eine klassische W-Box-Kernsequenz (TGAC) generiert, wird noch durch WRKY70 aktiviert. Unter der Annahme, dass eine direkte Interaktion zwischen WRKY70 und 30I-8_M1S1 vorliegt, spricht diese Tatsache dafür, dass WRKY70 sowohl an eine klassische W-Box-Kernsequenz als auch an die hier untersuchte Sequenz binden kann. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse also, dass die CGAC-Sequenz eine potentielle TFBS darstellt,

welche für die Transaktivierung durch WRKY70 essentiell ist. Möglicherweise spielen auch die vier Thymin-Nukleotide unmittelbar hinter der CGAC-Site eine Rolle, da die entsprechende Mutation eine abgeschwächte Aktivierung durch WRKY70 bewirkt (Mutation 10, Abbildung 28).

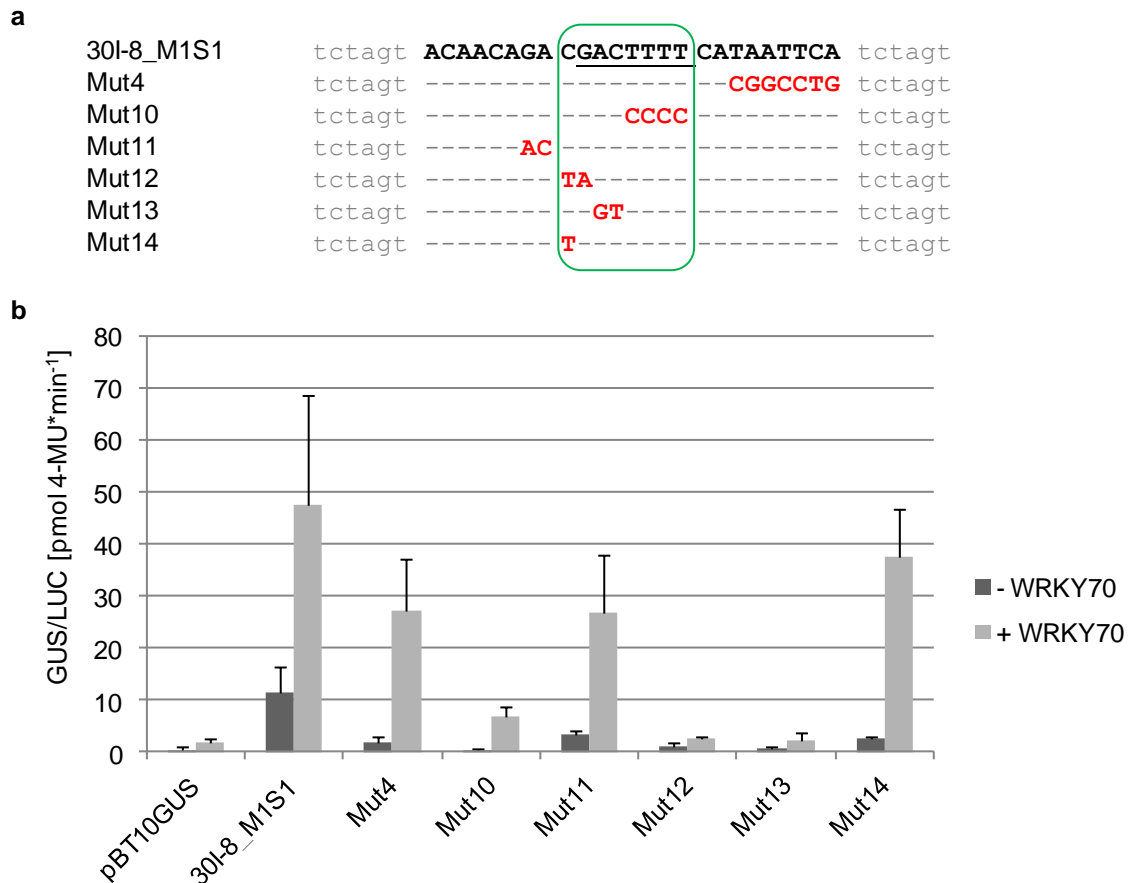


Abbildung 29: Aktivierbarkeit der Mutationen 4 sowie 10-14 von 30l-8_M1S1 durch WRKY70-Überexpression in *Arabidopsis*-Protoplasten

(a) Die in den Mutationen 4 und 10-14 modifizierten Nukleotide sind rot markiert. Der weiter eingegrenzte, für die Transaktivierung essentielle Bereich ist eingerahmt. Die potentielle Kernsequenz ist unterstrichen. (b) Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente in *Arabidopsis*-Protoplasten. -WRKY70: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +WRKY70: Kotransfektion mit WRKY70-Expressionsvektor

Um zu untersuchen, ob die Ergebnisse aus Petersilie-Protoplasten auch auf *Arabidopsis* übertragbar sind, wurden die Mutationen 4 und 10-14 (Abbildung 29 a) in den entsprechenden Reportervektor für *Arabidopsis*-Protoplasten (pBT10GUS) umkloniert und unter Mithilfe von Lili Christaller im Rahmen eines Laborpraktikums auf Aktivierung durch WRKY70 untersucht. Abbildung 29 b zeigt, dass die WRKY70-Responsivität in *Arabidopsis*-Protoplasten bei den Mutationen 4, 11 und 14 erhalten bleibt (alle Messwerte befinden sich in Anhang 19). Die Mutationen 12 und 13 sind, wie in Petersilie-Protoplasten, nicht mehr durch WRKY70-Überexpression aktiviert. Bei Mutation 10 bleibt nur eine schwache Induzierbarkeit

erhalten. Dieser Effekt ist deutlicher ausgeprägt als in Petersilie-Protoplasten (Abbildung 28) und stützt somit die Vermutung, dass die vier Thymin-Nukleotide ebenfalls zur TFBS gehören. Insgesamt ergibt sich in *Arabidopsis*-Protoplasten damit ein ähnliches Bild wie in Petersilie-Protoplasten. Durch Kombination der gezeigten Daten lässt sich die essentielle Region für die WRKY70-vermittelte Aktivierung in *Arabidopsis* auf die Sequenz CGACTTTT eingrenzen. Ob diese direkt durch WRKY70 gebunden wird oder ob evtl. eine indirekte Aktivierung vorliegt, wurde durch Gelshift-Experimente näher untersucht (5.10.)

Die für die WRKY70-vermittelte Aktivierung von 27D-10_M1S2 essentiellen Nukleotide konnten durch Mutationsanalyse nicht eingegrenzt werden

Genau wie für 30I-8_M1S1 sollte auch für die Sequenz 27D-10_M1S2 der für die WRKY70-Responsivität essentielle Sequenzbereich, also die potentielle TFBS, per Mutagenese bestimmt werden. Für eine erste Eingrenzung des Bereiches wurden die Mutationen 1, 4, 5 und 6 analysiert (Abbildung 30 a). Diese decken den zentralen Bereich mit der potentiellen Kernsequenz (Mutation 5) sowie zwei W-Box ähnliche Sequenzen im 5' bzw. 3' Bereich der Sequenz ab. Die Ergebnisse aus Petersilie-Protoplasten demonstrieren, dass Mutation 1 unverändert durch WRKY70-Überexpression aktivierbar ist, während Mutation 4 und 5 keine, bzw. nur abgeschwächte Aktivierung aufweisen (Abbildung 30, Anhang 18). Die von Mutation 1 betroffene W-Box ähnliche Sequenz im 3' Bereich scheint demnach nicht essentiell zu sein. Um den Einfluss der zentralen Region von 27D-10_M1S2 näher zu untersuchen, wurden zusätzlich die bereits vorhandenen Mutationen 6 bis 10 auf WRKY70-Responsivität untersucht (Abbildung 30). Es stellte sich hierbei heraus, dass keine dieser Mutationen zu einem völligen Verlust der Induzierbarkeit durch WRKY70 führt, obwohl sie den durch Mutation 5 betroffenen Bereich schrittweise abdecken. Auf Grund dieser Ergebnisse war die weitere Arbeitshypothese, dass die potentielle TFBS für WRKY70 nicht in diesem zentralen Bereich, sondern am 5' Ende der 27D-10_M1S2-Sequenz zu finden ist. Es wurden daher die Mutationen 11-14 entworfen (Abbildung 31 a). Die Mutationen 12 und 13 zielen auf die W-Box ähnliche TTGAGT-Sequenz (im revers komplementären Strang) ab, während Mutation 11 die zwei Nukleotide vor dieser Sequenz adressiert. Analog zum Vorgehen bei 30I-8_M1S1, wird mit Mutation 14 ein Nukleotid so modifiziert, dass aus der vorliegenden TTGAGT-Sequenz eine TTGACT-Sequenz wird, welche der klassischen W-Box entspricht (Abbildung 31 a).

Abbildung 31 b zeigt die in Petersilie-Protoplasten erhaltenen Ergebnisse für diese Mutationen (Einzelwerte, Anhang 18). Alle vier Mutationen sind deutlich durch WRKY70-Überexpression induziert. Im Vergleich zur Originalsequenz scheint Mutation 14 leicht schwächer zu sein, während die übrigen Mutationen teilweise deutlich höhere Indukti-

onen als die ursprüngliche 27D10_M1S2-Sequenz zeigen. Eine klare Definition der potentiellen TFBS ist auf Grundlage dieser und der zuvor gezeigten Ergebnisse nicht möglich. Es ist zu vermuten, dass hier keine direkte Interaktion zwischen WRKY70 und 27D-10_M1S2 stattfindet und dass z.B. ein kombinatorisches Element vorliegt, welches durch die kurzen Mutationen nicht inaktiviert wird. Dies würde erklären, warum die gezielte Untersuchung der W-Box ähnlichen Sequenzen ohne Erfolg blieb.

a

27D-10_M1S2	actaga	<u>CTCAAAGAA</u>	<u>TACTTTTCAAAGTGAACA</u>	actaga
Mut1	actaga	-----	-----ACAGGAC	actaga
Mut4	actaga	ACTGGGAG	-----	actaga
Mut5	actaga	-----	CGTCCCC	actaga
Mut6	actaga	-----	-----GGAC	actaga
Mut7	actaga	-----	-----CTGG	actaga
Mut8	actaga	-----	-----CCCC	actaga
Mut9	actaga	-----	CGTC	actaga
Mut10	actaga	-----AGG	C-----	actaga

b

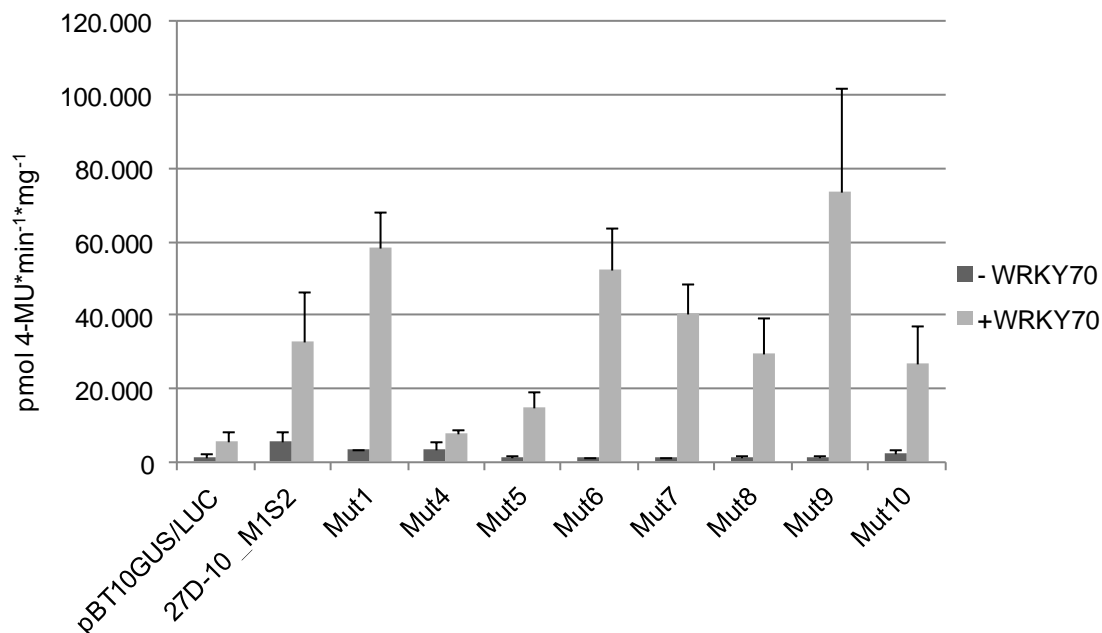


Abbildung 30: Aktivierbarkeit der Mutationen 1 sowie 4-10 von 27D-10_M1S2 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten

(a) Die in den Mutationen modifizierten Nukleotide sind rot markiert. Die Kernsequenz aus Gruppe 27 (TACTTTT), sowie zwei W-Box ähnliche Sequenzen sind unterstrichen. Der für die Transaktivierung durch WRKY70 essentielle Bereich ist eingerahmt. (b) Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten. -WRKY70: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +WRKY70: Kotransfektion mit WRKY70-Expressionsvektor

a

27D-10_M1S2	actaga	<u>CTCAAAGAATACTTTTCAAAGTGAACA</u>	actaga
Mut11	actaga	-----GA-----	actaga
Mut12	actaga	-----GG-----	actaga
Mut13	actaga	-----CT-----	actaga
Mut14	actaga	G-----	actaga

b

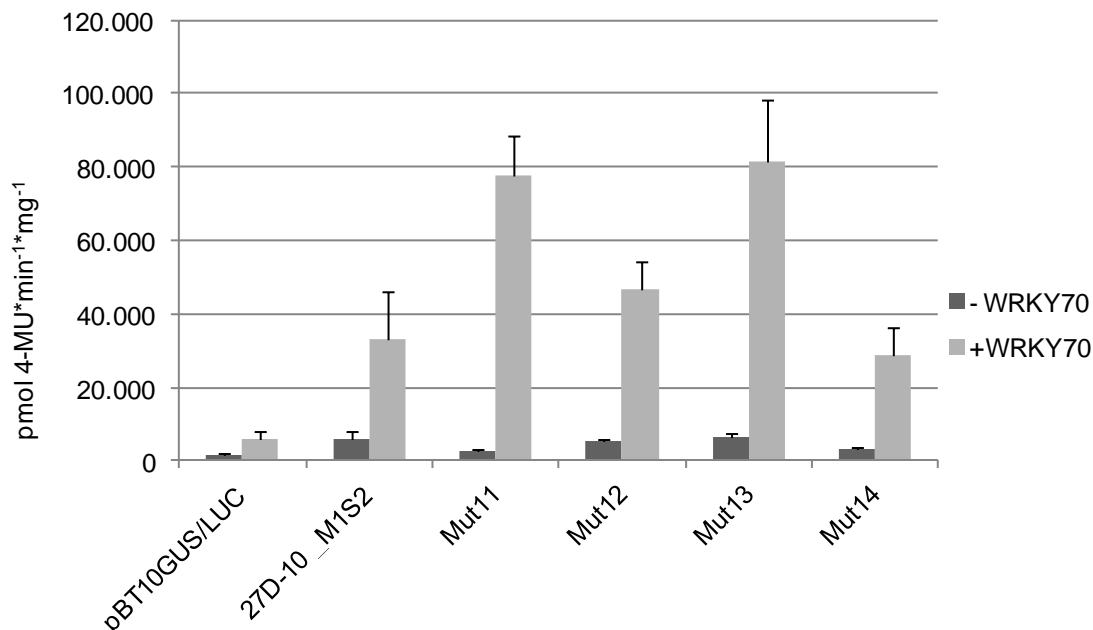


Abbildung 31: Aktivierbarkeit der Mutationen 11-14 von 27D-10_M1S2 durch WRKY70-Überexpression in Petersilie-Protoplasten

(a) Die in den Mutationen modifizierten Nukleotide sind rot markiert. Die Kernsequenz aus Gruppe 27 (TACTTTT) sowie die W-Box ähnliche Sequenz sind unterstrichen. (b) Ergebnisse der Ko-transfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten. -WRKY70: Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor; +WRKY70: Kotransfektion mit WRKY70-Expressionsvektor

5.8. Expression rekombinanter Transkriptionsfaktoren in *E. coli*

Es wurde in beiden Protoplasten-Systemen gezeigt, dass WRKY70 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 aktiviert sowie, dass SPL7-Überexpression zur Induktion von 30I-8_M1S1 führt. Gleichzeitig konnten die potentiellen TFBS für SPL7 und WRKY70 in 30I-8_M1S1 identifiziert werden. Um eine direkte Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit der Zielsequenz zu zeigen, wurden Gelshift-Experimente mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Dazu wurden die Transkriptionsfaktoren, wie unter 4.11.19 beschrieben, in geeignete Vektoren (pQE30-Serie) kloniert, in den *E. coli*-Expressionsstamm M15 eingebracht, die Expressionskultur gestartet und das Protein mit Hilfe des His-Tags und NiNTA-Agarose aufgereinigt (4.11.21).

SPL7

Im Falle des relativ großen SPL7-Proteins (ca. 90 kDa) gelang keine Expression bzw. Aufreinigung des kompletten Proteins (nicht gezeigt). Daher wurde eine verkürzte Variante des SPL7-Proteins (Aminosäuren 112-234), welche die DNA-Bindungsdomäne enthält (SPL7-DBD, Aminosäuren 137-215), kloniert und exprimiert. Abbildung 32 zeigt das repräsentative Ergebnis einer SDS-PAGE mit verschiedenen Fraktionen einer SPL7-DBD-Aufreinigung (weitere Ergebnisse befinden sich in Anhang 24).

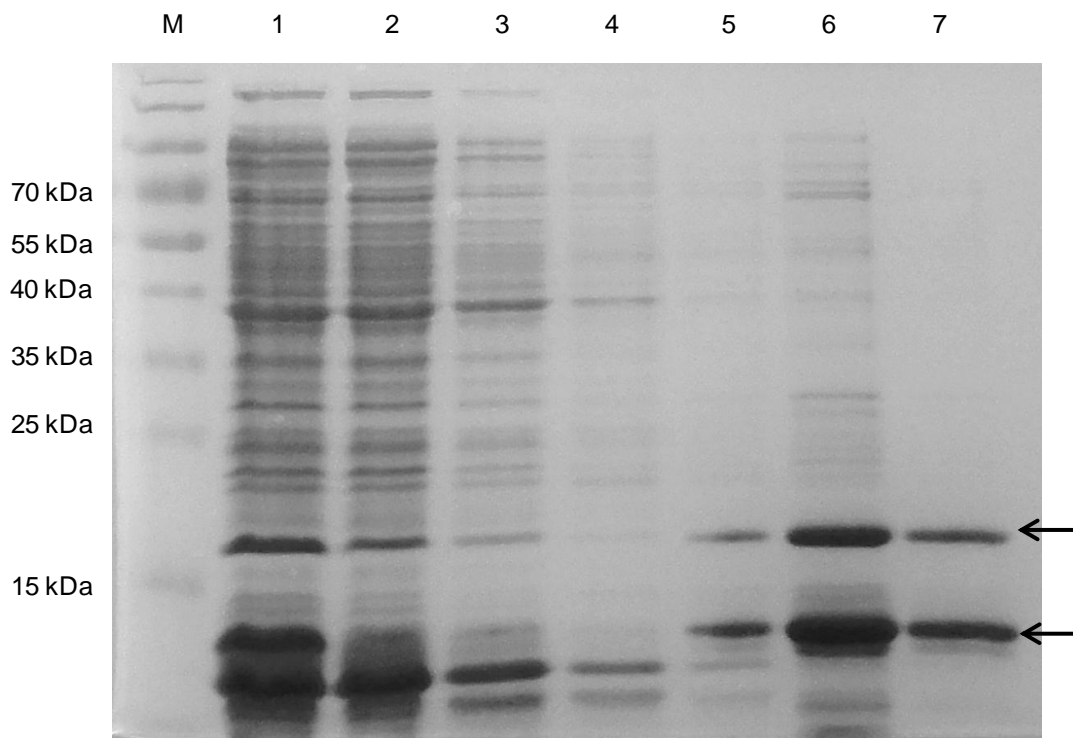


Abbildung 32: SDS-PAGE einer SPL7-DBD-Proteinaufreinigung

M: Größenstandard; 1: Geklärtes Zell-Lysat; 2: Nicht NiNTA-gebundene Proteine (Überstand); 3: Waschfraktion 1 (Puffer NPI-10); 4: Waschfraktion 2 (Puffer NPI-20); 5: Waschfraktion 3 (Puffer NPI-20); 6: Eluat 1; 7: Eluat 2. Markiert sind die angereicherten, potentiellen SPL7-DBD-Banden.

Es ist eine deutliche Anreicherung von zwei Proteinbanden im Eluat erkennbar (Abbildung 32, Spur 6 und 7, Pfeile). Beide eluieren kaum in den Waschfraktionen und sind im zweiten Eluat nahezu ohne weitere Verunreinigung vorhanden. Die theoretische Größe des SPL7-DBD Proteins einschließlich des 6xHis-Tags beträgt 15,7 kDa. Die Bande mit dem höheren Molekulargewicht entspricht in etwa dieser Größe. Die zweite Bande könnte einem nicht vollständig translatierten SPL7-DBD-Protein entsprechen, welches auf Grund des N-terminalen His-Tags dennoch aufgereinigt wurde.

Ein Nachweis des His-Tags mittels Western Blot lieferte nur ein sehr schwaches Signal bei der entsprechenden Größe und war auch nur bei einem von zwei untersuchten Eluaten nachweisbar (nicht gezeigt). Auf eine weitere Optimierung des Western Blots wurde jedoch verzichtet, da die Ergebnisse der Aufreinigung eindeutig waren. Daher wurde das SPL7-DBD-Protein für Gelshift-Experimente verwendet (5.9).

WRKY70

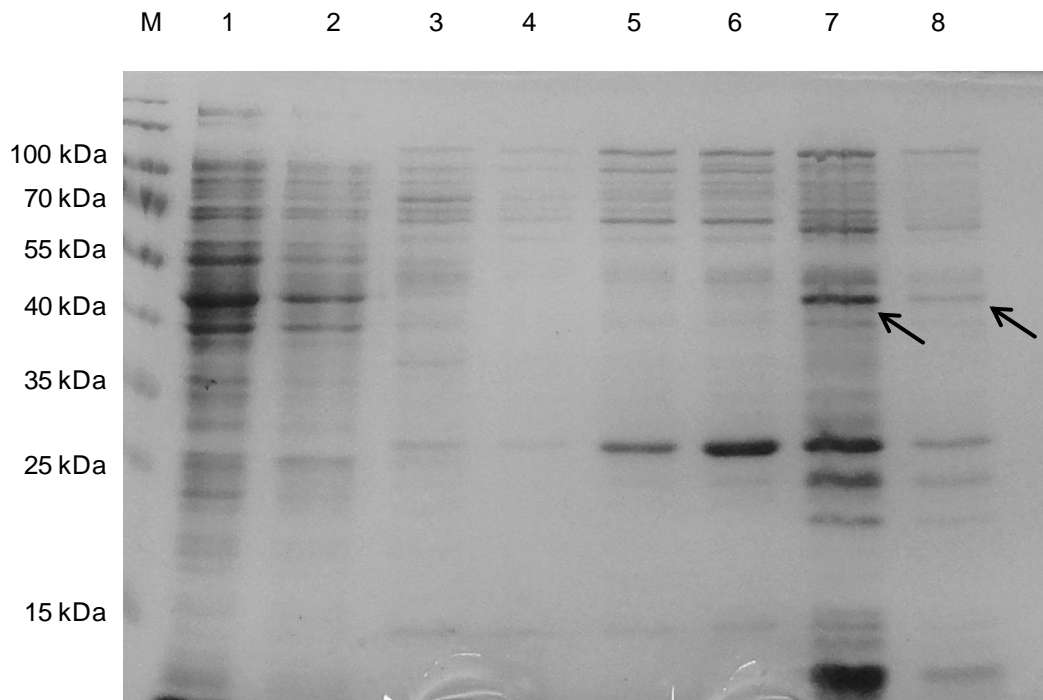
Ebenso wie SPL7 wurde auch das vollständige WRKY70-Protein in *E. coli* exprimiert und unter nativen Bedingungen eine Aufreinigung mittels des His-Tags durchgeführt. Ein Beispiel für eine solche Aufreinigung des Proteins ist in Abbildung 33 gezeigt (Ergebnisse weiterer Proteinaufreinigungen befinden sich im Anhang 25).

Für das rekombinante Protein mit 6xHis-Tag wird eine theoretische Größe von 34,6 kDa erwartet. Das potentiell als rekombinantes WRKY70 identifizierte Protein wandert bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 46 kDa (Abbildung 33 a, Spur 7 und 8, Pfeile). Da das Eluat relativ viele verschiedene Proteine enthält und die Zuordnung daher nicht eindeutig ist, zeigt Abbildung 33 b eine parallel durchgeführte Proteinaufreinigung aus *E. coli* M15-Zellen, welche nur leeres pQE31-Expressionsplasmid enthalten. Die potentiellen WRKY70-Banden treten hier nicht auf. Um die WRKY70-Bande mit größerer Sicherheit zu identifizieren, wurde ein Western Blot zum Nachweis des His-Tags durchgeführt.

In Abbildung 34 ist das Ergebnis des entsprechenden Western Blots gezeigt: In allen drei untersuchten WRKY70-Aufreinigungen tritt im Western Blot ein Signal auf Höhe der potentiellen WRKY70-Bande auf (Abbildung 34, Spur 1-3). In zwei der drei untersuchten Extrakte treten außerdem Banden unterhalb von 15 kDa auf. Diese könnten, ähnlich wie bei SPL7-DBD (s.o.), mit unvollständig translatiertem Protein erklärt werden. In dem Proteinextrakt aus M15-Zellen mit leerem Expressionsvektor (pQE31) ist keinerlei Signal nachweisbar (Abbildung 34, Spur 4).

Auf Grund der eindeutigen Ergebnisse des Western Blots wurde das aufgereinigte WRKY70-Protein für Gelshift-Experimente verwendet. Die beobachtete Diskrepanz zwischen erwarteter und auftretender Wanderungsgeschwindigkeit im Gel konnte auf Grundlage der DNA-Sequenz des Konstrukts nicht begründet werden.

a



b

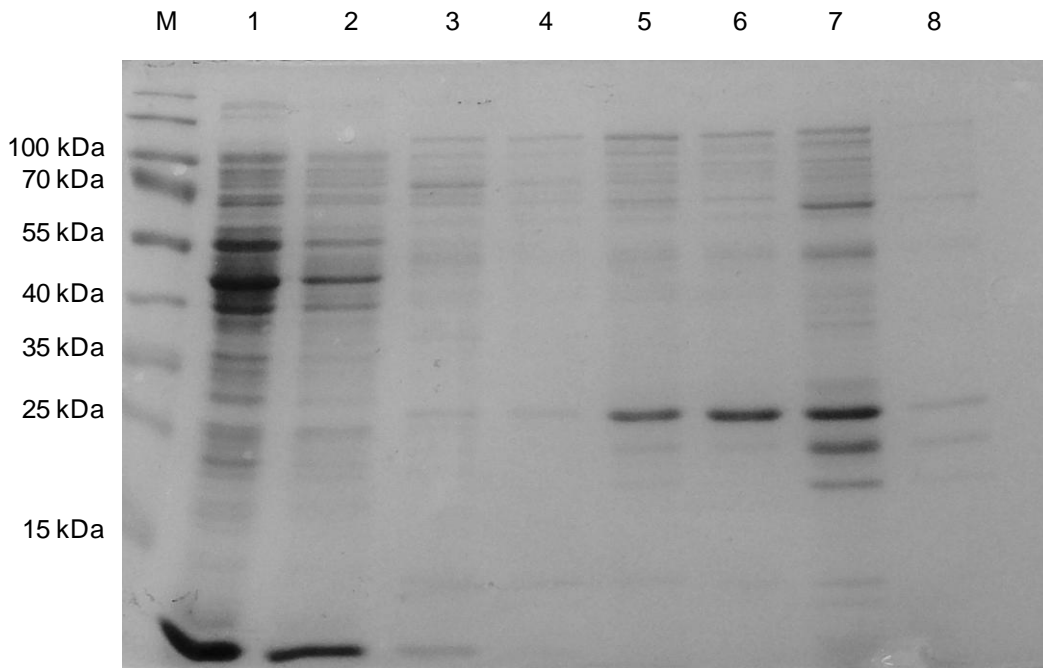


Abbildung 33: SDS-PAGE einer WRKY70-Proteinaufreinigung

(a) WRKY70-Aufreinigung (b) Aufreinigung aus M15-Zellen mit leerem pQE31-Vektor. M: Größenstandard; 1: Nicht NiNTA-gebundene Proteine (Überstand); 2: Waschfraktion 1 (Puffer NPI-10); 3: Waschfraktion 2 (Puffer NPI-20); 4: Waschfraktion 3 (Puffer NPI-20); 5: Waschfraktion 4 (Puffer NPI-30); 6: Waschfraktion 5 (Puffer NPI-40); 7: Eluat 1; 8: Eluat 2. Die potentiellen WRKY70-Banden sind markiert (a) und treten in der Kontrolle mit leerem pQE31-Vektor nicht auf (b).

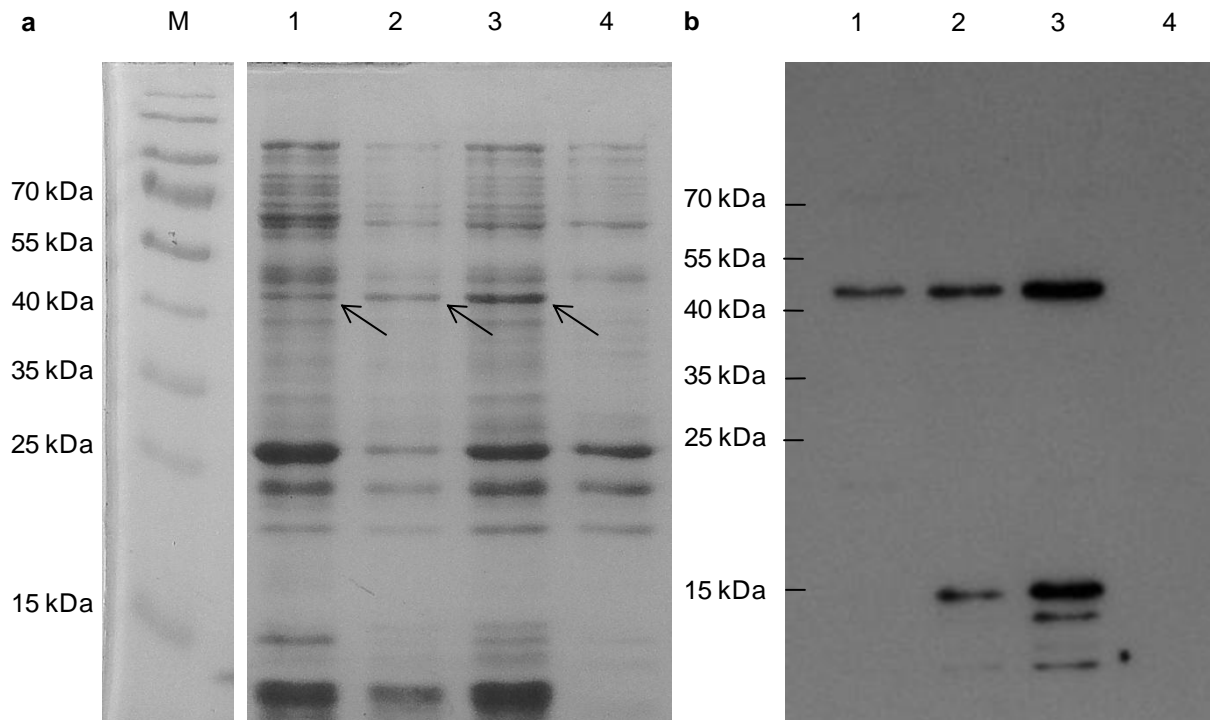


Abbildung 34: Western Blot zum Nachweis des His-getaggten WRKY70-Proteins

(a) Coomassie gefärbtes Replikat des geblotteten Gels. (b) Detektion des His-Tags mit Anti-His Antikörper. M: Größenstandard; 1-3: verschiedene WRKY70-Extrakte; 4: Extrakt aus M15-Zellen mit leerem pQE31-Vektor.

5.9. SPL7 interagiert direkt mit 30I-8_M1S1

Zur Analyse der möglichen direkten Interaktion von SPL7 mit 30I-8_M1S1 wurden Gelshift-Experimente mit aufgereinigtem SPL7-DBD-Protein (5.8) durchgeführt. Dazu wurden die Oligonukleotide 30I-8_M1S1_f und 30I-8_M1S1_r einer Biotin-Markierung unterzogen (4.11.26), annealt (4.11.2) und als Sonde für ein Gelshift-Experiment genutzt (4.11.27). Als spezifischer Kompetitor wurde unmarkiertes dsOligonukleotid in 200-fachem molaren Überschuss verwendet. Abbildung 35 zeigt, dass es bei Verwendung von ungefähr 0,5 µg SPL7-DBD-Protein zu einem schwachen Signal deutlich oberhalb der ungebundenen dsOligonukleotide kommt (Abbildung 35, Spur 3, Pfeil). Dieses Signal ist bei Verwendung des unmarkierten Kompetitors nicht mehr detektierbar (Abbildung 35, Spur 4). Dies zeigt eine direkte Interaktion der DNA-bindenden Domäne von SPL7 mit der 30I-8_M1S1-Sequenz. Basierend auf den Ergebnissen der transienten Überexpressionsexperimente in Petersilie-Protoplasten findet diese Interaktion sehr wahrscheinlich mit der GTAC-Site am Rand der 30I-8_M1S1-Sequenz statt (vgl. 5.6)

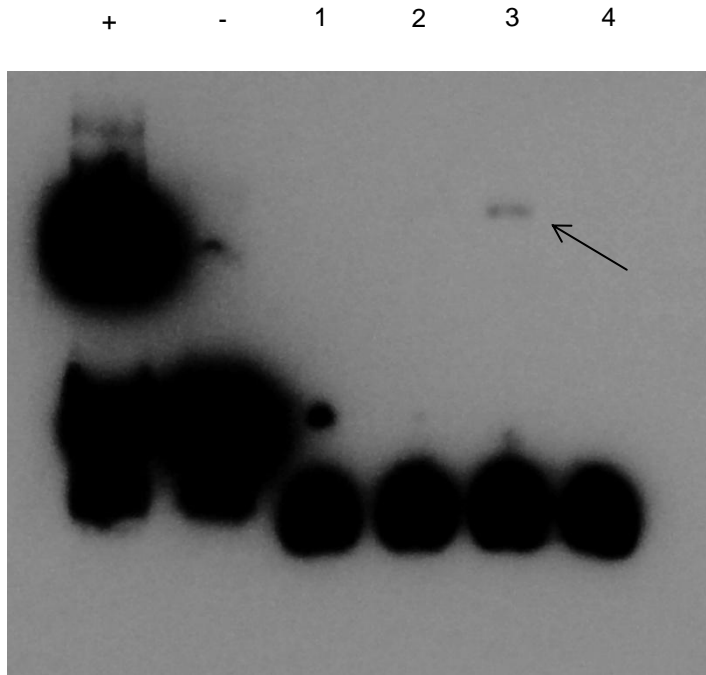


Abbildung 35: Gelshift-Experiment mit SPL7-DBD

+: Positivkontrolle; -: Negativkontrolle; 1: markierte Sonde ohne Protein; 2: Sonde mit ca. 0,25 µg Protein; 3: Sonde mit ca. 0,5 µg Protein; 4: Sonde mit 0,5 µg Protein und 200-fachem molaren Überschuss unmarkierter Kompetitor.

5.10. WRKY70 bindet die für die Transaktivierung notwendige Sequenz CGACTTTT direkt

Analog zu SPL7-DBD wurde auch die Interaktion von WRKY70 mit 30I-8_M1S1 mittels Gelshift-Assays untersucht. Dazu wurden ca. 50-100 ng WRKY70-Protein eingesetzt und Biotin-markiertes 30I-8_M1S1-dsOligonukleotid als Sonde verwendet. Abbildung 36 zeigt, dass es bei Inkubation von WRKY70 zusammen mit der Biotin-markierten Sonde zu einer klaren Reduzierung der elektrophoretischen Mobilität im Vergleich zur ungebundenen Sonde kommt. Dabei entstehen im Wesentlichen drei Signale mit unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten. Diese werden erwartungsgemäß bei Zugabe eines 1000-fachen molaren Überschusses unmarkierten 30I-8_M1S1-Oligonukleotids nicht mehr detektiert (Abbildung 36, spez. Kompetitor). Eine direkte Interaktion von WRKY70 mit der entsprechenden Sequenz scheint hier also stattzufinden. Da die WRKY70-Proteinisolation trotz Aufreinigung über NiNTA-Agarose nie zu absoluter Reinheit des rekombinanten Proteins führte (vgl. 5.8), wurde versucht, die Identität des Proteins in den Gelshift-Experimenten mittels Supershift nachzuweisen. Dies ist allerdings nicht gelungen (Daten nicht gezeigt). Um dennoch indirekt zeigen zu können, dass es sich bei dem Protein, welches den Shift verursacht,

um WRKY70 handelt, wurde in dem gezeigten Gelshift-Experiment die bereits zuvor erwähnte Proteinaufreinigung aus M15-Zellen mit leerem Expressionsvektor (5.8) als Kontrolle eingesetzt (Abbildung 36, pQE31-Extrakt). Diese sollte ein ähnliches Gemisch an kontaminierenden Proteinen enthalten wie das WRKY70-Isolat, allerdings ohne das rekombinante Protein (vgl. Abbildung 33). In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass der Proteinextrakt ohne WRKY70 keinen Shift der Sonde auslöst. Die Protein-DNA-Interaktion ist also spezifisch für

das WRKY70 enthaltende Proteinisolat. Indirekt kann daraus geschlossen werden, dass WRKY70 und nicht ein Protein aus *E. coli* an die 30I-8_M1S1-Sequenz bindet.

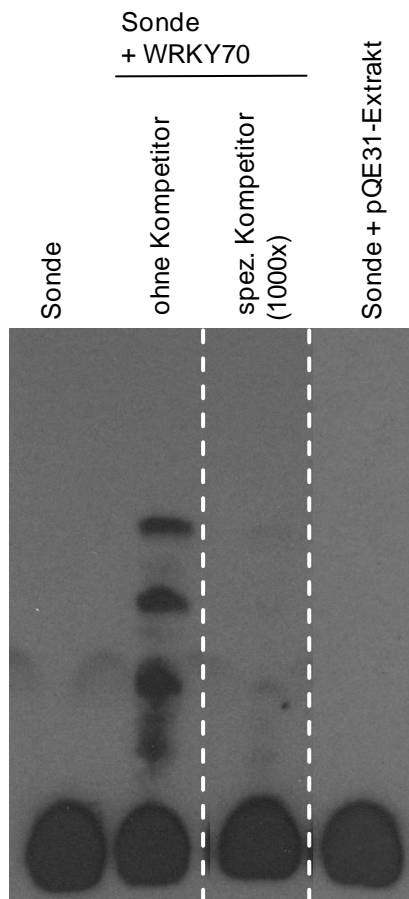


Abbildung 36: 30I-8_M1S1 wird spezifisch von WRKY70 gebunden

Alle Spuren enthalten Biotin-markierte 30I-8_M1S1-Sonde. Unmarkierter Kompetitor wurde im 1000-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Das gezeigte Ergebnis stammt aus einem Experiment. Zur Vereinfachung sind nicht relevante Spuren nicht gezeigt.

In einem weiteren Experiment kamen zur Untersuchung der Bindungsspezifität verschiedene, nicht markierte dsOligonukleotide als Kompetitoren zum Einsatz (Abbildung 37 a). Diese wurden auf Grundlage der in *Petersilie*- bzw. *Arabidopsis*-Protoplasten beobachteten WRKY70-Responsivität ausgewählt (Abbildung 37). Eine Konkurrenz der WRKY70-Bindung wird durch die Kompetitoren Mut1, Mut4, Mut11 und Mut14 erreicht (Abbildung 37 b). Diese ist im Fall von Mut4 nahezu vollständig, bei den übrigen Mutationen zeigt sich im Vergleich zum unmutierten 30I-8_M1S1 eine schwächere Konkurrenz. Aus diesen Ergebnissen lässt sich indirekt schließen, dass die genannten Sequenzen von WRKY70 gebunden werden können und die entsprechenden Mutationen 1, 4 und 11 daher nicht in der TFBS liegen. Da die Mutationen 1, 4 und 11 außerhalb der CGACTTTT-Sequenz liegen, stimmt dieses Ergebnis mit den Erwartungen überein (vgl. 5.7). Mutation 14 ist ein Sonderfall, da diese eine klassische W-Box Kernsequenz generiert (TGAC). Die entsprechende Sequenz ist in der Lage, die WRKY70-30I-8_M1S1 Interaktion zu kompetieren, wird also vermutlich ebenfalls von WRKY70 gebunden. Keine Konkurrenz tritt bei Verwendung der Mutationen 10, 12 und 13 auf. Folglich werden diese Sequenzen selbst in 1000-fachem Überschuss nicht von WRKY70 gebunden (Abbildung 37 b). Dieses Ergebnis bestätigt die Beobach-

tungen in *Petersilie*- und *Arabidopsis*-Protoplasten. Die drei Mutationen decken zusammengekommen den als potentielle TFBS definierten Sequenzabschnitt CGACTTTT ab. Die hier

gezeigten Ergebnisse wurden mit einer unabhängig hergestellten WRKY70-Präparation mit ähnlichem Ergebnis wiederholt (Anhang 27).

a

30l-8_M1S1	ctagt	ACAACAGA	CGACTTTT	CATAATTCA	t
Mut11	(2x) ctagt	-----AC	-----	-----	t
Mut12	(2x) ctagt	-----	TA-----	-----	t
Mut13	(2x) ctagt	-----	-----GT	-----	t
Mut14	(2x) ctagt	-----	T-----	-----	t
Mut1	ctagt	GTGGTGAG	-----	-----	t
Mut4	ctagt	-----	-----	CGGCCTG	t
Mut10	ctagt	-----	-----CCCC	-----	t

b

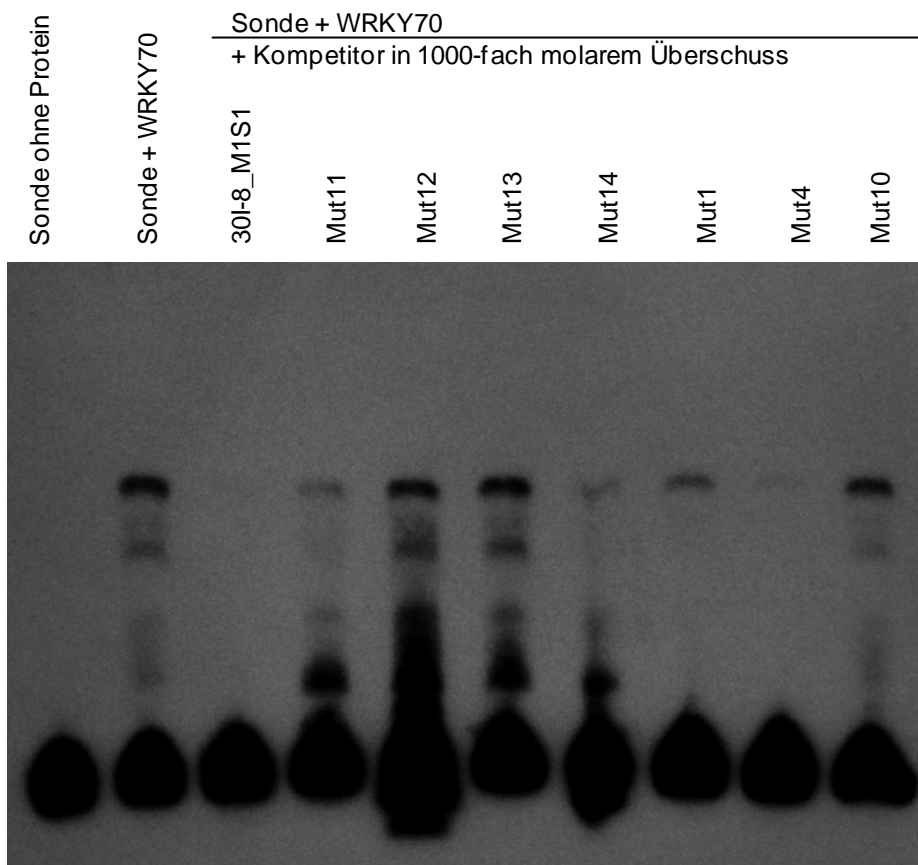


Abbildung 37: Gelshift-Experiment mit verschiedenen 30l-8_M1S1-Mutationen und WRKY70

(a) Verwendete Oligonukleotide. In den Mutationen sind die modifizierten Nukleotide hervorgehoben. Die mit „(2x)“ markierten Oligonukleotide wurden als Dimere eingesetzt. Alle übrigen wurden als Monomere verwendet. Gezeigt ist immer nur die Monomersequenz. Die Dimere bestehen aus zwei direkten Kopien der gesamten Sequenz inklusive der Linker. Die durch die Experimente bestätigte TFBS ist eingekreist. (b) Ergebnis des Gelshift-Experiments. Biotin-markiertes 30l-8_M1S1-Oligonukleotid diente als Sonde, die Kompetitoren wurden jeweils in 1000-fachem molarem Überschuss verwendet.

5.11. WRKY70 interagiert auch mit weiteren Sequenzen aus Motivgruppe 27

WRKY70 interagiert *in vitro* direkt mit einer CGACTTTT-Sequenz innerhalb von 30I-8_M1S1 (5.10). Diese TFBS enthält die bei Koschmann *et al.* für Motivgruppe 27 definierte Kernsequenz GACTTTT (Koschmann *et al.*, 2012). Neben den beiden in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 aus Motivgruppe 27 kommen also noch weitere Pep25-responsive Sequenzen aus dieser Gruppe als potentielle Interaktionspartner in Frage, da sie Sequenzen enthalten, die der WRKY70-TFBS ähnlich sind (Abbildung 38 a). Daher wurden diese eng verwandten Sequenzen als Kompetitoren in einem weiteren Gel-shift-Experiment verwendet. Ziel war es, die Spezifität der WRKY70 DNA-Bindung weiter zu analysieren und Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von WRKY70 an der Pep25-Responsivität der anderen Gruppe 27-Sequenzen zu erhalten.

Die als Kontrollen verwendeten Kompetitoren Mut12 und Mut13 können den auftretenden Shift erwartungsgemäß nicht kompetieren, während die unmarkierte 30I-8_M1S1-Originalsequenz zu einem Verlust des Signals führt (Abbildung 38 b, unabhängiges Replikat in Anhang 27). Die Sequenzen 30I-8_M1S2 (21) und 30I-8_M1S3 (22), die eine TGACTTTT-Sequenz anstelle der CGACTTTT-Sequenz tragen, sind beide in der Lage, die WRKY70-Bindung an 30I-8_M1S1 zu kompetieren. Das ist auf Grundlage der Ergebnisse von Mutation 14 (vgl. Abbildung 37) zu erwarten gewesen, da diese die ursprüngliche CGACTTTT-Sequenz in eine TGACTTTT-Sequenz überführt und somit die gleiche Kernsequenz erzeugt, wie bei den beiden hier untersuchten Kompetitoren. Sequenz 21S_M3S1 (18), welche an der ersten Position der TFBS ein Adenin statt eines Cytosins trägt, kann auch im 1000-fachen Überschuss die Interaktion zwischen WRKY70 und 30I-8_M1S1 nicht kompetieren. Diese Sequenz wird demnach nicht von WRKY70 gebunden. Ebenso führt die Verwendung von 27D-10_M1S2 (23) nicht zu einem Verlust des Signals. Die Ergebnisse aus den Protoplasten-Systemen stützen diese Beobachtung, da zwar eine Transaktivierung der 27D-10_M1S2-Sequenz beobachtet, aber keine potentielle TFBS gefunden wurde (5.7). Der Unterschied zur TFBS in 30I-8_M1S1 liegt hier in den ersten beiden Nukleotiden, sodass eine ATACTTTT-Sequenz anstelle von CGACTTTT vorliegt. Aus dieser Beobachtung folgt, dass die Transaktivierung von 27D-10_M1S2 durch WRKY70 vermutlich indirekt ist. Die Fähigkeit zur Interaktion von 30H-8_M1S2 (24) mit WRKY70 scheint nur sehr schwach zu sein, da das Signal des Shifts zwar schwächer wird, jedoch nicht verschwindet. Die Affinität von WRKY70 zu dieser Sequenz (GGACTTTC) ist demnach reduziert. Es ist allerdings auch

möglich, dass die W-Box-Sequenz TTGACC im 3' Bereich von 30H-8_M1S2 und nicht die Kernsequenz für die beobachtete Konkurrenz verantwortlich ist.

a

30I-8_M1S1	ctagt	ACAACAGA	CGACTTTT	CATAATTCA	t	
Mut12	ctagt	-----	TA -----	-----	t	
Mut13	ctagt	-----	-- GT ----	-----	t	
18 *	21S_M3S1	a	CTTCCCGATC	AGACTTTT	CTACGCAAGAGAAAATTA	actag
21 *	30I-8_M1S2	a	TTTATGTT	TGACTTTT	GTCATATAG	actag
22 *	30I-8_M1S3	a	GAGAGAGATAGTT	TGACTTTT	TGACTGAAGAACGA	actag
23 *	27D-10_M1S2	a	CTCAAAGA	ATACTTTT	CAAAGTGAACA	actag
24	30H-8_M1S2	ctagt	TGGTCAGCATGTT	GGACTTTT	CAAATTCATTGACC	actag

b

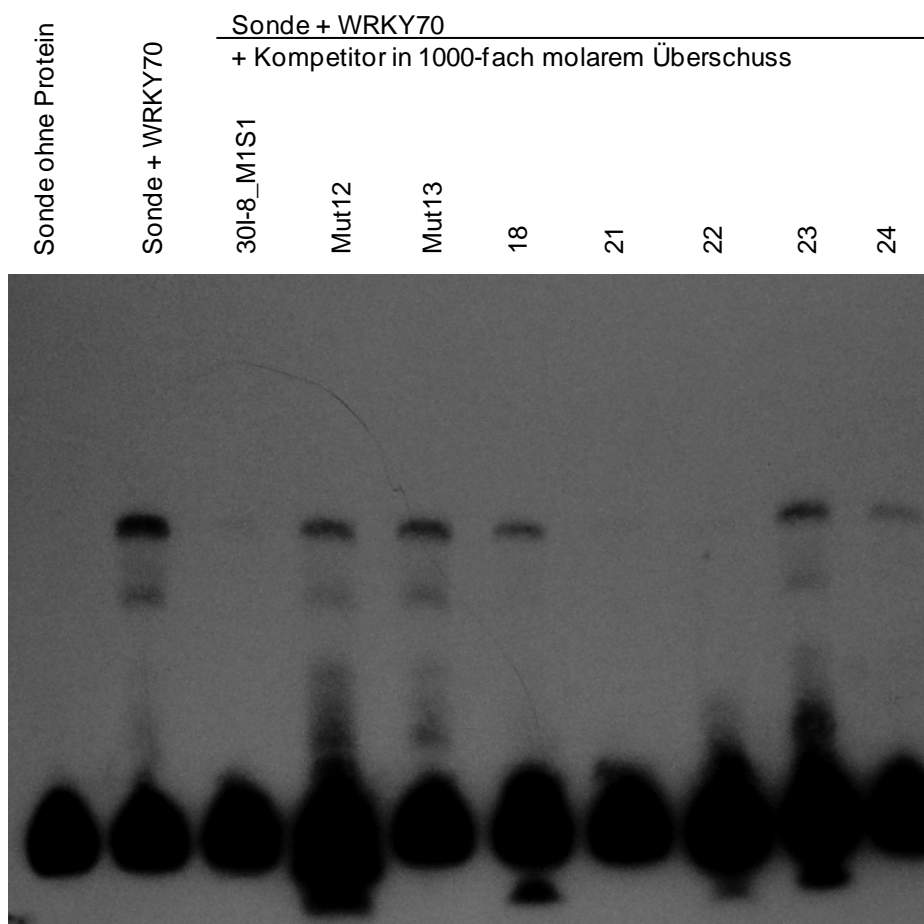


Abbildung 38: Gelshift-Experiment mit WRKY70 und verschiedenen Kompetitoren der Motivgruppe 27

(a) Sequenzen der zur Konkurrenz verwendeten dsOligonukleotide. Die potentielle WRKY70-TFBS ist eingerahmt. Mit * markierte Sequenzen sind revers komplementär angegeben. (b) Ergebnis des Gelshift-Experiments. Die unmarkierten Kompetitoren wurden in 1000-fach molarem Überschuss verwendet. Die Sequenzbezeichnungen (Name und Nummer) entsprechen denen bei Koschmann *et al.* (2012).

Zusammenfassend lässt sich aus den hier gezeigten Ergebnissen ableiten, dass WRKY70 die zuvor postulierte CGACTTTT-Site in 30I-8_M1S1 bindet. Durch einen Vergleich der in den gezeigten Gelshift-Experimenten erhaltenen Ergebnisse könnte die WRKY70-TFBS auf die Konsensussequenz YGACTTTT erweitert werden (Abbildung 39). Die schwache Interaktion mit 30H-8_M1S2 wird dabei aus den oben genannten Gründen nicht berücksichtigt.

30I-8_M1S1	ctagt	ACAACAGA	CGACTTTT	CATAATTCA	t
21 * 30I-8_M1S2	a	TTTATGTT	TGACTTTT	GTCATATAG	actag
22 * 30I-8_M1S3	a	GAGAGAGATAGTT	TGACTTTT	TGACTGAAGAACGA	actag
Konsensus			YGACTTTT		

Abbildung 39: Alignment der durch WRKY70 gebundenen Sequenzen

Mit * markierte Sequenzen sind revers komplementär angegeben. Die TFBS-Region ist eingerahmt und eine Konsensussequenz für den entsprechenden Bereich angegeben. Y=T/C

5.12. Die WRKY70-TFBS liegt innerhalb der Pep25-responsiven Region von 30I-8-M1S1

Um zu zeigen, dass die für WRKY70 definierte TFBS (CGACTTTT) direkt mit der Pep25-Responsivität von 30I-8_M1S1 in Petersilie-Protoplasten assoziiert ist, wurden die entsprechenden Mutationen 11 bis 14 im Petersilie-Protoplasten-System analysiert. Diese Mutationen wurden bisher noch nicht auf Pep25-Responsivität untersucht. Abbildung 40 zeigt zusätzlich die entsprechenden Messwerte von Mutation 10 (Alle Messwerte befinden sich in Anhang 2). Es wird deutlich, dass jede der Mutationen eine negative Auswirkung auf die Induzierbarkeit durch Pep25 hat. Einen vollständigen Verlust der selbigen bewirken aber nur die Mutationen 10, 12 und 13, während bei den Mutationen 11 und 14 eine leichte Induzierbarkeit bestehen bleibt. Dies zeigt, dass Mutationen von nur zwei Nukleotiden (Mutation 12 und 13) innerhalb der WRKY70-TFBS ausreichend sind, um die Pep25-Responsivität vollständig aufzuheben. Weiterhin lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass zumindest in Petersilie-Protoplasten auch die flankierenden Nukleotide vor der TFBS (Mutation 11) eine Rolle für die effiziente Induktion durch Pep25 spielen. Es zeigt sich außerdem, dass die an eine klassische W-Box angenäherte Mutation 14 nur schwach induzierbar ist. Ähnliches wurde bereits bei den Gelshift-Experimenten beobachtet (Abbildung 37). Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der WRKY70-TFBS und der Pep25-Responsivität gibt.

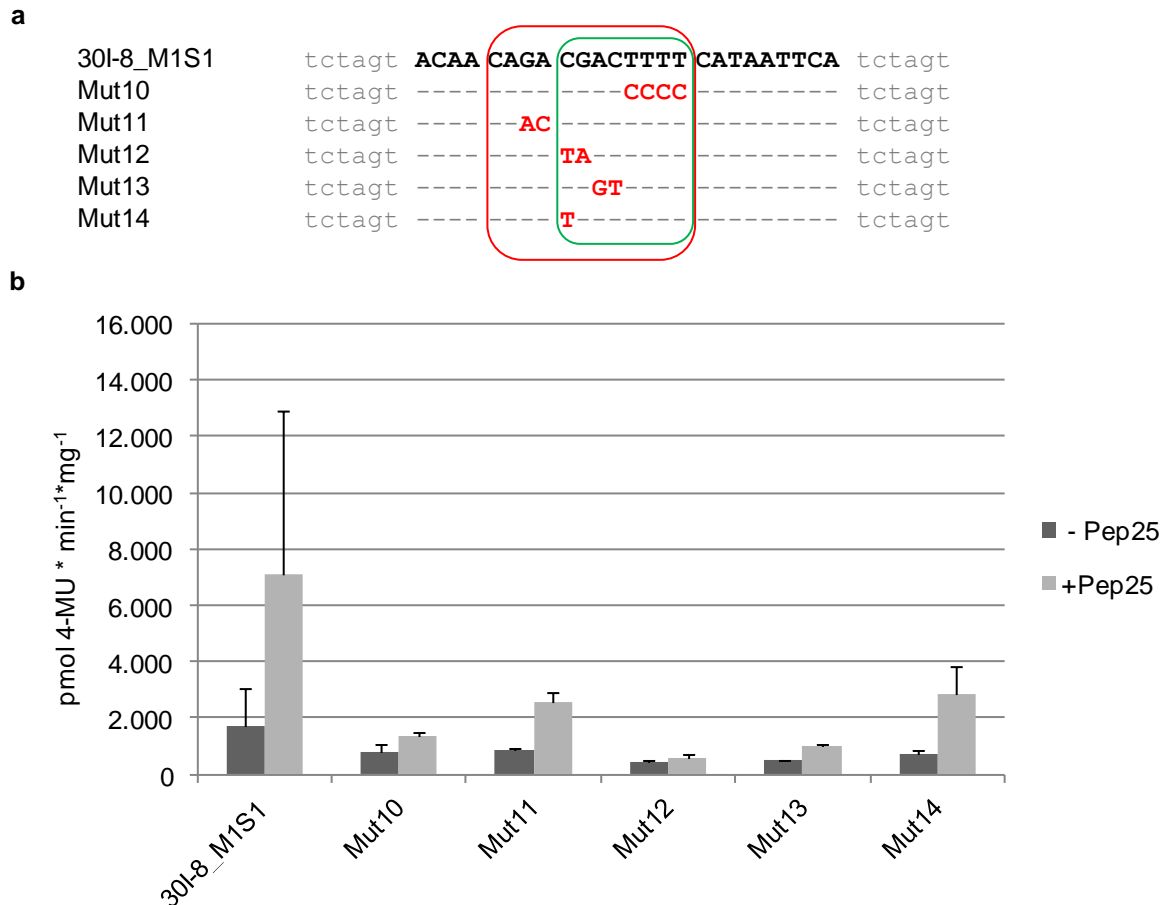


Abbildung 40: Mutationen in der WRKY70-TFBS führen zum Verlust der Pep25-Induzierbarkeit

(a) Die Mutationen 10 und 12-14 betreffen die WRKY70-TFBS (grüne Markierung), Mutation 11 liegt unmittelbar vor der der TFBS. Der zuvor bestimmte Pep25-responsive Bereich ist rot eingrahmt. (b) Pep25-Induzierbarkeit der entsprechenden Mutationen in Petersilie-Protoplasten.

5.13. Die postulierte WRKY70-TFBS ist in möglichen Zielgenen angereichert

Um die Relevanz der unter 5.11 beschriebenen möglichen Konsensussequenz als WRKY70-TFBS zu überprüfen, wurden bioinformatische Analysen vorgenommen. Als Grundlage dienten publizierte Microarray-Expressionsdaten aus WRKY70-Überexpressions- bzw. Antisense-Suppressionslinien (Li *et al.*, 2004). Aus Expressionsdaten von 314 Genen wurden jeweils die 100 am stärksten induzierten bzw. reprimierten Gene der Überexpressionslinie ausgewählt (Anhang 26). Mittels des Web-Tools POBO (Kankainen und Holm, 2004, <http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/poxo/pobo/pobo>) wurde in den Promotorsequenzen (500 bp upstream des TSS) dieser Gene nach der Konsensussequenz YGACTTTT gesucht und auf eine signifikante Anreicherung im Vergleich zum Hintergrundmodell (*A. thaliana*-Genom) untersucht (4.11.41). Dazu ermittelt POBO die Häufigkeit der gesuchten Sequenz in

den zu untersuchenden Promotoren und vergleicht diese mit der Häufigkeit im Hintergrundmodell. Durch sogenanntes „Bootstrapping“ erstellt POBO dazu, basierend auf Pseudoclustern, künstliche Verteilungen und führt statistische Analysen durch (Kankainen und Holm, 2004).

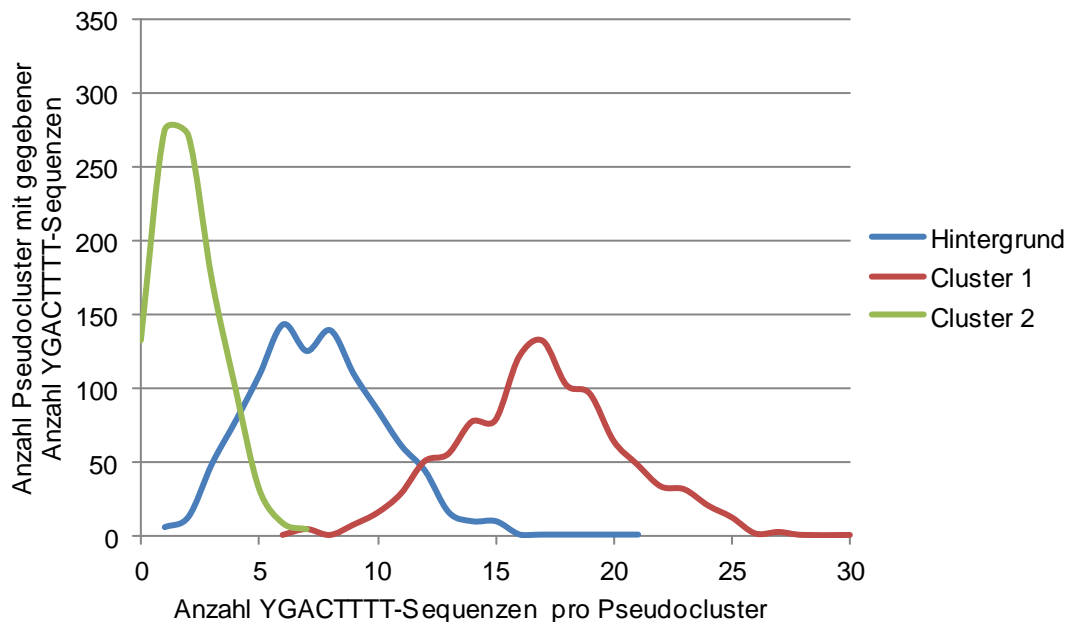


Abbildung 41: Mittels POBO ermittelte Verteilung der WRKY70-TFBS in WRKY70-responsiven Pseudoclustern

Je 1.000 Pseudocluster bestehend aus je 100 Promotorsequenzen (je 500 bp) wurden auf Grundlage der WRKY70-responsiven Gene bzw. des *A. thaliana* Hintergrundmodells von POBO erstellt (Cluster 1: Induzierte Gene, Cluster 2: Reprimierte Gene). Gezeigt ist die mittels Bootstrapping erstellte Häufigkeitsverteilung der Konsensussequenz YGACTTTT in den verschiedenen Pseudoclustern.

Die POBO-Analyse zeigt, dass 17 von 100 Promotoren der durch WRKY70-Überexpression hochregulierten Gene die gesuchte Konsensussequenz YGACTTTT jeweils einmal enthalten (0,17-mal pro Sequenz). Von den 100 Promotoren der reprimierten Gene enthalten nur zwei die Sequenz (0,02-mal pro Sequenz). Im Hintergrundmodell wurden 31.353 *A. thaliana*-Promotorsequenzen der Länge 500 bp untersucht, wobei 2.235 Promotoren die Sequenz enthalten. Insgesamt tritt diese 2.364-mal auf (0,08-mal pro Sequenz). Abbildung 41 zeigt die Verteilung der Konsensussequenz in den mittels Bootstrapping erstellten Pseudoclustern (je 100 Promotoren von 500 bp). Dabei wird deutlich, dass die Verteilung der Konsensussequenz in den Pseudoclustern aus WRKY70-aktivierten Genen (Cluster 1) sich deutlich vom Hintergrundmodell unterscheidet. Die Häufigkeitsverteilung ist deutlich in Richtung einer höheren Frequenz der Konsensussequenz verschoben. Dahingegen ist die Häufigkeitsverteilung der Pseudocluster aus reprimierten Genen (Cluster 2) in Richtung einer geringeren Frequenz

verschoben. Die von POBO durchgeführten t-Tests (Zweistichproben t-Test) zeigen, dass der Unterschied zwischen den beiden Clustern und dem Hintergrund sowie zwischen den beiden Clustern untereinander signifikant ist (Tabelle 4). Gleichzeitig zeigt der mittels ANOVA-Test (Varianzanalyse) ermittelte F-Faktor ($F=7589,23$), dass die Einteilung der Cluster gut mit dem Auftreten der Konsensussequenz korreliert (Kankainen und Holm, 2004).

Tabelle 4: Ergebnisse der t-Tests zwischen den verschiedenen Häufigkeitsverteilungen der YGACTTTT-Sequenz in koregulierten Genen

t-Test	t-Wert	Freiheitsgrade	p-Wert
<i>Cluster 1-Hintergrund</i>	66,01	1998	<0,0001
<i>Cluster 2-Hintergrund</i>	-55,18	1998	<0,0001
<i>Cluster 1-Cluster 2</i>	-123,27	1998	<0,0001

Um zu überprüfen, wie spezifisch die oben erläuterten Ergebnisse für die YGACTTTT-Sequenz sind, wurden analoge POBO-Analysen mit verschiedenen Derivaten der Konsensussequenz durchgeführt. Hierzu wurden zwei Sequenzen, die den Mutationen 12 und 13 von 30l-8_M1S1 entsprechen, verwendet (Abbildung 28 a, TAACTTTT und YGGTTTTT). Weiterhin wurde eine Sequenz, in welcher die vier Thymin Nukleotide der WRKY70-TFBS variiert sind (YGACTAAT), analysiert. Die in Anhang 28 gezeigten Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von denen, die mit der YGACTTTT-Sequenz erhalten wurden. Zwar ist teilweise eine leichte Anreicherung in den WRKY70-induzierte Genen erkennbar, diese ist aber nicht so deutlich wie mit der WRKY70-TFBS. Die F-Faktoren, die widerspiegeln wie gut die Cluster mit dem Auftreten der jeweiligen Sequenz korrelieren, sind durchweg deutlich kleiner als mit der Konsensussequenz für die WRKY70-TFBS.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte, basierend auf den bei Koschmann (Koschmann *et al.*, 2012) identifizierten *cis*-Elementen, eine Pep25-responsive Region in den beiden eng verwandten Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 identifiziert werden. Durch gezielte Mutagenese der jeweiligen Sequenzen wurde der Pep25-responsive Bereich auf 12 (30I-8_M1S1) bzw. 16 Nukleotide (27D-10_M1S2) eingegrenzt (Abbildung 6, Abbildung 8). Beide Regionen enthalten die in der Motivgruppe 27 hoch konservierte Kernsequenz (GACTTTT bzw. TACTTTT). Das führt zu der Annahme, dass diese bei Koschmann (Koschmann *et al.*, 2012) identifizierte neue Kernsequenz sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die Pep25- bzw. Pathogen-Induzierbarkeit dieser Sequenzen hat. Motivgruppe 27 wurde ursprünglich anhand ihres „family binding profil“ (FBP) als Motivgruppe mit großer Ähnlichkeit zu W-Box-Sequenzen, die häufig mit der Pathogenantwort assoziiert sind, identifiziert (Koschmann *et al.*, 2012). Da die beiden Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 aber keine W-Boxen enthalten und dennoch Pep25-Responsivität vermitteln war es interessant zu ermitteln, welche TF für die Responsivität verantwortlich sind. Yeast One-Hybrid-Screenings führten zur Identifikation von SPL7 und WRKY70 als potentielle Regulatoren von 30I-8_M1S1. Auf Grund der in 30I-8_M1S1 nicht vorhandenen W-Boxen war besonders die Identifikation von WRKY70 überraschend. Sowohl für SPL7 als auch für WRKY70 konnte mittels einer Kombination von Transaktivierungsexperimenten in Protoplasten und Gel-shift-Experimenten eine direkte Interaktion mit 30I-8_M1S1, nicht aber mit 27D-10_M1S2 gezeigt werden. Im Folgenden soll die Bedeutung der Interaktion von SPL7 bzw. WRKY70 mit der 30I-8_M1S1-Sequenz diskutiert werden. Eine zentrale Frage hierbei ist, ob die TF *in vivo* eine Bedeutung in der Pep25- bzw. Pathogen-Responsivität von 30I-8_M1S1 haben könnten. Im Hinblick auf WRKY70 wird auch die identifizierte TFBS vertiefend diskutiert, da es sich hierbei nicht um eine klassische W-Box handelt.

6.1. Die Interaktion von 30I-8_M1S1 und SPL7 hat keine Relevanz für die Pep25-Responsivität

Zunächst soll an dieser Stelle die Interaktion von 30I-8_M1S1 mit SPL7 diskutiert werden. Bei SPL7 handelt es sich um einen TF aus der Gruppe der SBP (Squamosa Promoter-Binding Protein)-Faktoren. Die SBP-Familie ist eine Familie von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren, welche zuerst in *Antirrhinum majus* als Regulatoren der frühen Blütenentwicklung beschrieben wurde (Klein *et al.*, 1996) und die konservierte SBP-DNA-Bindungsdomäne trägt (Yamasaki *et al.*, 2004). In *A. thaliana* sind 16 SBP-Gene annotiert (Guo *et al.*, 2008),

welche in verschiedene Prozesse involviert sind. Hierzu zählen z.B. die Regulation der Blütenentwicklung (Cardon *et al.*, 1997) und der vegetativen Entwicklung (Stone *et al.*, 2005) sowie die Kontrolle von Gibberellin-abhängigen Entwicklungsprozessen (Zhang *et al.*, 2007b). Der in dieser Arbeit mittels Yeast One-Hybrid-Screening identifizierte TF SPL7 spielt eine wichtige Rolle in der Kupferhomöostase, wobei er die Expression mehrerer microRNAs und weiterer für die Kupferantwort wichtiger Gene reguliert. Der TF bindet dabei an GTAC-Motive unter anderem im Promotor von *miR398* sowie *miR408* und reguliert so deren Expression unter Kupfer-Mangel (Yamasaki *et al.*, 2009; Zhang und Li, 2013). Eine GTAC enthaltende Konsensussequenz wurde als TFBS für SBP-Proteine vorgeschlagen (Cardon *et al.*, 1999) und die GTAC-Site als essentiell für die Bindung ausgewählter SBP-DNA-Bindungsdomänen bestätigt (Birkenbihl *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008). Auf Grundlage dieser Daten wurde in der vorliegenden Arbeit eine GTAC-Site in der 30I-8_M1S1-Sequenz als potentielle Bindungsstelle identifiziert. Diese stammt allerdings nur zur Hälfte aus der bioinformatisch identifizierten Sequenz. Die ersten zwei Nukleotide der Sequenz kommen auf Grund der für die Klonierung verwendeten Linker zustande (5.6). Um die Interaktion zwischen SPL7 und 30I-8_M1S1 zu bestätigen, wurden transiente Kotransfektionsexperimente in Petersilie-Protoplasten sowie Gelshift-Experimente mit der DNA-Bindungsdomäne aus SPL7 durchgeführt (5.5 und 5.9). Die Ergebnisse zeigen, dass die transiente Überexpression von SPL7 zu einer Aktivierung der Reportergenaktivität in den Protoplasten führt. Diese ist bei der eng verwandten 27D-10_M1S2-Sequenz nicht zu beobachten. Letztere enthält keine GTAC-Sequenz, was für die Vermutung spricht, dass diese für die Interaktion nötig ist. Weiterhin zeigte die Analyse von zwei mutierten 30I-8_M1S1-Sequenzen, dass die Aktivierung der Reportergenaktivität durch Mutation der GTAC-Sequenz verloren geht, jedoch durch eine distal gelegene Mutation nicht negativ beeinflusst wird (Abbildung 26). Die Demonstration einer direkten Interaktion zwischen der SPL7-DNA-Bindungsdomäne und 30I-8_M1S1 mittels Gelshift-Experimenten belegt, dass die Ergebnisse aus dem Protoplasten-System sehr wahrscheinlich auf direkter Interaktion mit SPL7 und nicht auf indirekter Aktivierung des Reportergens beruhen (Abbildung 35).

Zusammenfassend ist damit belegt, dass die mittels Yeast One-Hybrid identifizierte Interaktion zwischen SPL7 und 30I-8_M1S1 tatsächlich stattfindet. Die biologische Relevanz dieser Beobachtung ist jedoch fraglich. Da die GTAC-Sequenz nur durch die Klonierung zustande kommt und auch im nativen Promotor von At5g12930 (dem Promotor, aus welchem 30I-8_M1S1 stammt) an der entsprechenden Position nicht vorliegt, spielt diese TFBS vermutlich für die Pathogen-Responsivität des Promotors keine Rolle. Auch eine Involvierung in die Pep25-Responsivität von 30I-8_M1S1 in Protoplasten bzw. in die Pathogen-Responsivität in den transgenen Reportergen-Linien erscheint unwahrscheinlich.

Dies lässt sich aus den Mutagenese-Experimenten zur Einschränkung der Pep25-responsiven Region und auch aus den zu SPL7 existierenden Expressionsdaten ableiten: Die Mutagenese der 30I-8_M1S1-Sequenz hat gezeigt, dass Mutation 6 keinen negativen Einfluss auf die Induzierbarkeit durch Pep25 in Petersilie-Protoplasten hat (Abbildung 6). Bei dieser Mutation handelt es sich um die gleiche Sequenz, welche durch transiente Überexpression von SPL7 nicht mehr aktivierbar ist, da sie die GTAC-Sequenz zu GTGT modifiziert (Abbildung 26). Da SPL7 an diese Sequenz offensichtlich nicht mehr bindet, die Pep25-Responsivität aber erhalten bleibt, kann dieser TF - bzw. ein Homolog aus Petersilie - als Aktivator ausgeschlossen werden.

Auch die Analyse von Microarray-Daten zur Expression von SPL7 unter verschiedenen Stressbedingungen mittels des *Arabidopsis* EFP-Browsers (<http://www.bar.utoronto.ca>, Winter *et al.*, 2007) spricht nicht für eine Bedeutung von SPL7 in der Pathogenantwort. Zwar ergeben sich bei verschiedenen Pathogeninfektionen (*B. cinerea* bzw. *Pto* DC3000) bis zu 1,3-fache Steigerungen der gemessenen Signalintensität, die absoluten Intensitäten bewegen sich dabei aber auf relativ geringem Niveau (nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist damit gezeigt worden, dass SPL7 mit der GTAC-Sequenz in 30I-8_M1S1 interagiert, dies aber keine Relevanz für die Pep25-Responsivität der Sequenz hat. Eine wichtige Erkenntnis in diesem Zusammenhang ist, dass der Einfluss des experimentellen Systems (d.h. zum Beispiel die Linker für die Klonierung) bei der Analyse der bioinformatisch identifizierten Sequenzen nicht außer Acht gelassen werden darf. Die hier beobachtete Interaktion hat zwar offensichtlich keinen Zusammenhang mit der Pep25-Responsivität, es ist aber natürlich denkbar, dass in anderen Fällen funktionelle, Pathogen-responsive *cis*-Sequenzen durch die Linker-Sequenz entstehen. Weiterhin ist es möglich, dass die SPL7-Bindung in dem vorliegenden Fall zwar nicht die Pathogen-Responsivität, wohl aber die Grundaktivität der 30I-8_M1S1-Sequenz, z.B. in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, beeinflusst. Diese Möglichkeit wird später in einem anderen Zusammenhang diskutiert (6.5).

Auch wenn sich SPL7 nicht als möglicher *in vivo* Regulator der Gruppe 27-Sequenzen herausgestellt hat, so zeigen die Ergebnisse dennoch, dass die in dieser Arbeit gewählte Kombination aus Yeast One-Hybrid, Kotransfektionsexperimenten und Gelshift-Assays ein geeignetes System zur Analyse möglicher Protein-DNA-Interaktionen darstellt. Trotz einiger individueller Nachteile der drei Systeme, führt die Kombination der Techniken zu einer erfolgreichen Analyse, wobei es wichtig ist die einzelnen Ergebnisse kritisch zu interpretieren. So werden, wie in der vorliegenden Arbeit anhand von JAG und WRKY53 deutlich wird, im

Yeast One-Hybrid-System relativ viele falsch-positive Klone identifiziert. Die Transaktivierungsassays in Protoplasten sind eine schnelle Möglichkeit solche falsch-positiven TF auszuschließen. Dabei ist wiederum zu beachten, dass diese Experimente nicht die physiologischen Bedingungen in der Pflanze widerspiegeln und dass die starke Expression des TF sowie die hohe Abundanz des Promotor-Reportergenkonstrukts wiederum zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (Wehner *et al.*, 2011). Deshalb sind direkte Untersuchungen, wie die hier durchgeführten Gelshift-Experimente, von großer Bedeutung. Durch Gelshift-Experimente wird auch die Möglichkeit einer indirekten Aktivierung des Reportergens über weitere, durch den untersuchten TF aktivierte TF, berücksichtigt. Die Identifikation einer TFBS mittels Mutationsanalyse in Protoplasten und anschließenden Gelshift-Experimenten konnten hier erfolgreich durchgeführt und eine direkte Interaktion von SPL7 mit der Zielsequenz gezeigt werden.

6.2. WRKY70, ein zentraler Regulator der Pathogenantwort, bindet die Sequenz CGACTTTT in 30I-8_M1S1

Neben der oben diskutierten Bindung von SPL7 an 30I-8_M1S1 wurde, durch Kombination aus Yeast One-Hybrid-Screening und transienter Expression, WRKY70 als zweiter TF identifiziert, der diese Sequenz spezifisch bindet. Bei WRKY70 handelt es sich um einen TF der WRKY-Familie aus *A. thaliana*.

Die Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren findet sich in Landpflanzen und Grünalgen (Ülker und Somssich, 2004) und umfasst in *A. thaliana* 74 Mitglieder (Rushton *et al.*, 2010). Das gemeinsame Merkmal, das zur Klassifizierung dieser Faktoren genutzt wird, ist ihre DNA-Bindungsdomäne (WRKY-Domäne). Dabei handelt es sich um eine 60 Aminosäuren umfassende Region, an deren N-terminalem Ende sich die hoch konservierte, namensgebende Aminosäuresequenz WRKYGQK befindet. Außerdem beinhaltet die WRKY-Domäne ein Zinkfinger-Motiv (Rushton, 1996; Eulgem *et al.*, 2000). Basierend auf der Zahl der vorhandenen WRKY-Domänen und der Art der Zinkfinger-Motive werden WRKY-TF in drei Gruppen unterteilt. Dabei werden WRKY-Proteine mit zwei WRKY-Domänen in Gruppe I und die mit nur einer WRKY-Domäne in Gruppe II eingeteilt. Auf Grund eines abweichenden Zinkfinger-Motivs werden einige Proteine mit ebenfalls nur einer WRKY-Domäne in Gruppe III eingeordnet (Eulgem *et al.*, 2000). Eine weitere Einteilung der WRKY-Faktoren in Subgruppen erfolgt anhand phylogenetischer Daten, die auf Grundlage der konservierten WRKY-Domäne ermittelt wurden (Zhang und Wang, 2005).

Neben der Aminosäuresequenz der DNA-Bindungsdomäne ist auch die entsprechende Bindungssequenz auf DNA-Ebene sehr hoch konserviert. Die sogenannte W-Box wird von vielen WRKY-Proteinen gebunden und als minimal notwendige, aber nicht zwangsläufig ausreichende TFBS für WRKY-TF beschrieben. Die entsprechende Konsensussequenz lautet TTGACY (Rushton, 1996; Eulgem *et al.*, 2000; Ciolkowski *et al.*, 2008).

Das prominenteste Feld, mit dem WRKY-Proteine immer wieder in Verbindung gebracht werden, ist die Pathogenantwort (Pandey und Somssich, 2009). WRKY-Faktoren können während der Pflanze-Pathogen-Interaktion sowohl als negative als auch als positive Regulatoren der Resistenzreaktion wirken (Eulgem und Somssich, 2007; Rushton *et al.*, 2010). Beispiele sind AtWRKY4, dessen Knockout-Mutante erhöhte Sensitivität gegen *B. cinerea* aufweist, jedoch bei Überexpression erhöhte Empfindlichkeit gegen *Pto* DC3000 verursacht (Lai *et al.*, 2008) oder AtWRKY48, der ein negativer Regulator der Resistenz gegen *Pto* DC3000 ist (Xing *et al.*, 2008). WRKY-Proteine spielen auch in diversen anderen biologischen Prozessen eine Rolle (Rushton *et al.*, 2010). Beispielsweise wurde für WRKY10 aus *Arabidopsis* eine Rolle in der Samenentwicklung (Luo *et al.*, 2005) und für WRKY44 in der Trichomentwicklung beschrieben (Johnson *et al.*, 2002). Mehrere WRKY-Faktoren wurden auch im Zusammenhang mit Blattseneszenz untersucht (Robatzek und Somssich, 2001; Zhou *et al.*, 2011; Ülker *et al.*, 2007). In der abiotischen Stressantwort, z.B. bei Salzstress (Jiang und Deyholos, 2009) oder in der Hitze- bzw. Trockenheitstoleranz (Wu *et al.*, 2009b), sind ebenfalls WRKY-TF involviert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der WRKY70-Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* als Interaktionspartner der 30I-8_M1S1-Sequenz identifiziert. WRKY70 ist ein bereits relativ gut untersuchter Transkriptionsfaktor. Er gehört zur Gruppe III der WRKY-Proteine und nimmt eine gewisse Sonderposition ein, da die Identität mit dem nächsten verwandten WRKY-Faktor WRKY54 nur 54% beträgt (Li *et al.*, 2004). Auf Protein-Ebene sind die WRKY-Domänen von WRKY70 und WRKY54 zu 80% ähnlich, außerhalb der WRKY-Domäne nur zu 35 %. Dieser Wert ist noch vergleichsweise hoch, da im Vergleich zu anderen WRKY-Proteinen aus Klasse III außerhalb der WRKY-Domäne nur Ähnlichkeiten zwischen 6 und 12 % erreicht werden (Besseau *et al.*, 2012). WRKY70 wurde als regulatorischer Knotenpunkt in der Interaktion der teilweise antagonistischen Salizylsäure (SA)- bzw. Jasmonat (JA)-abhängigen Signalwege in der pflanzlichen Pathogenabwehr beschrieben (Abbildung 42). *WRKY70* wird dabei durch SA-Akkumulation induziert, was dann zur Induktion SA-responsiver Gene und gleichzeitig zur Repression JA-responsiver Gene führt. Umgekehrt kommt es während der JA-vermittelten Pathogenantwort zur Repression von *WRKY70*. Dies führt dann zur Derepression der JA-responsiven Gene (Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006).

SA und JA sind pflanzliche Hormone, die unter anderem an der Regulation der Pathogenantwort beteiligt sind (Vlot *et al.*, 2009; Browse, 2009). Die Salizylsäure-abhängige Pathogenantwort wird in der Regel bei Infektionen mit biotrophen Pathogenen aktiviert und führt neben der Aktivierung von Abwehrgenen, wie z.B. *PR1*, zur sogenannten systemisch erworbenen Resistenz (SAR, Vlot *et al.*, 2009). Diese zeichnet sich durch eine Breitspektrum-Pathogenresistenz in nicht infiziertem, systemischen Gewebe der Pflanze aus und kann das Auftreten von Sekundärinfektionen verhindern (Durrant und Dong, 2004). Ein weiterer Effekt der SA-abhängigen Pathogenantwort ist die teilweise Repression JA-abhängiger Gene (Glazebrook *et al.*, 2003; Pieterse *et al.*, 2012). Die JA-vermittelte Pathogenantwort wird zu- meist von nekrotrophen Pathogenen ausgelöst und führt zur Expression von Genen wie *PDF1.2*, welche der Pathogenabwehr dienen (Vijayan *et al.*, 1998; Glazebrook, 2005; Robert-Seilantantz *et al.*, 2011). Die antagonistische Regulation der beiden Signalwege ist für die Pathogenantwort entscheidend. Ein fehlerhaftes Gleichgewicht kann den Verlauf einer Pathogeninfektion drastisch beeinflussen. Beispielsweise führt die Überexpression SA-responsiver Abwehrgene in der *Arabidopsis mpk4*-Mutante zu erhöhter Sensitivität gegen Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* (Brodersen *et al.*, 2006). Es gibt

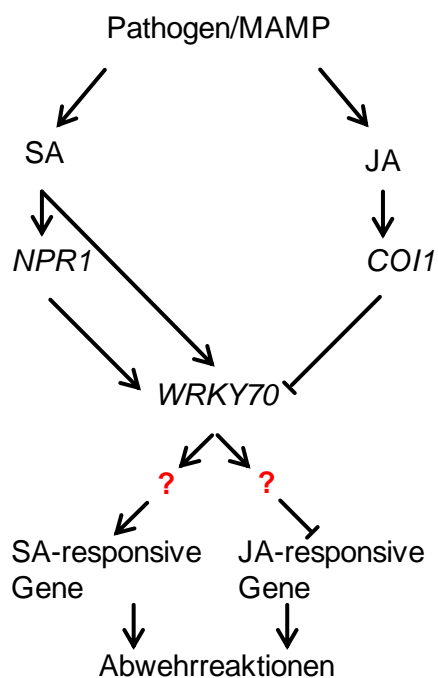


Abbildung 42: WRKY70 als Regulator der SA/JA vermittelten Pathogenantwort

WRKY70 wird durch SA/*NPR1* induziert und führt zur Aktivierung SA-responsiver Gene bzw. Repression JA-responsiver Gene. Während der JA-vermittelten Pathogenantwort wird *WRKY70* über einen *COI1* abhängigen Weg reprimiert. Die direkten *WRKY70*-Zielgene sind unbekannt.

Nach: Li *et al.* (2004)

allerdings auch Hinweise, dass es zu synergetischen Effekten zwischen beiden Signalwegen, z.B. bei Infektion mit *B. cinerea*, kommt (AbuQamar *et al.*, 2006). Die ausgeglichene Regulation zwischen beiden Wegen mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen für die Abwehr eines spezifischen Pathogens ist demnach ein entscheidender Punkt in der gesamten Pathogenantwort (Mur, 2005; Pieterse *et al.*, 2012). Die Rolle als Vermittler zwischen beiden Signalwegen, die *WRKY70* zugeschrieben wird, ist daher von großer Bedeutung.

Die Expression von *WRKY70* wird in einem zumindest teilweise von *NPR1* unabhängigen Weg durch SA induziert (Li *et al.*, 2004, Abbildung 42). Ein Regulator, der diese Induktion durch direkte Interaktion mit dem *WRKY70*-Promotor vermittelt, ist AtMYB44, der sowohl durch SA als auch durch JA induziert wird (Shim *et al.*, 2013). Experimente

mit *WRKY70* überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen zeigen Repression der JA-induzierten Genexpression von *PDF1.2*. Dies deutet auf einen negativen Einfluss der *WRKY70*-Expression auf die JA-vermittelte Pathogenantwort hin (Abbildung 42, Li *et al.*, 2006). Ein positiver Einfluss auf SA-abhängige Genexpression wurde ebenfalls beobachtet, auch wenn es im Falle von *PR1* zu teilweise widersprüchlichen Beobachtungen kommt. So zeigen Li *et al.*, dass in *WRKY70*-Überexpressionslinien die SA-induzierte *PR1*-Expression verstärkt ist und dass es zur konstitutiven Expression eines *PR1*-Transkripts kommt. Dieses ist länger als das native *PR1*-Transkript und dient evtl. als Vorläufer. Eine *WRKY70*-Antisense-Suppressionslinie zeigt reduzierte SA-Responsivität der *PR1*-Expression (Li *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigen Ülker *et al.*, dass eine *wrky70*-Mutante erhöhte basale Expression von *PR1* aufweist (Ülker *et al.*, 2007).

Da die SA/JA-vermittelte Genexpression in *wrky70*-Mutanten nicht beeinflusst ist, scheint die regulatorische Funktion von *WRKY70* redundant zu sein (Ren *et al.*, 2008; Leon-Reyes *et al.*, 2010), auch wenn hier ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse existieren (Li *et al.*, 2006). Dennoch zeigt sich die Wichtigkeit von *WRKY70* als Knotenpunkt der Pathogenabwehr z.B. an der erhöhten Resistenz einer *WRKY70*-überexprimierenden Linie gegen das biotrophe Pathogen *Erysiphe cichoracearum* und einer gleichzeitig verminderten Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *A. brassicicola* (Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Auch die Empfindlichkeit gegenüber *B. cinerea* und *Hyaloperonospora parasitica* ist in *wrky70*-Mutanten erhöht (AbuQamar *et al.*, 2006; Knoth *et al.*, 2007).

Neben der hier beschriebenen Rolle in der Pathogenabwehr wird *WRKY70* auch als negativer Regulator der Blattseneszenz in *A. thaliana* beschrieben. So zeigen *wrky70*-Knock-out-Mutanten beispielsweise eine deutlich frühere Blattseneszenz (Ülker *et al.*, 2007). Untersuchungen an *wrky70/wrky54*-Doppelmutanten legen dabei einen kooperativen Effekt mit *WRKY54* nahe. Außerdem konnte in diesem Zusammenhang im Yeast Two-Hybrid-System eine direkte Interaktion mit dem ebenfalls der Gruppe III der *WRKY*-TF angehörigen *WRKY30* (At5g24110) nachgewiesen werden (Besseau *et al.*, 2012). Dies ist interessant, da die zur Motivgruppe 27 gehörende Sequenz 22 (30I-8_M1S3) aus dem Promotor von *WRKY30* stammt (Koschmann *et al.*, 2012) und offensichtlich von *WRKY70* gebunden werden kann (Abbildung 38).

Zur Identifikation möglicher Zielgene von *WRKY70* wurden Microarray-Experimente mit *WRKY70*-Überexpressionslinien bzw. Antisense-Suppressionslinien durchgeführt (Li *et al.*, 2004). Dabei wurden sowohl induzierte als auch reprimierte Gene identifiziert. Diese tragen häufig W-Boxen in ihren Promotoren (Li *et al.*, 2004). Ob sie direkt oder indirekt von

WRKY70 reguliert werden und an welche *cis*-Sequenzen der TF tatsächlich binden kann, wurde aber nicht untersucht. Die Bindungssequenz von WRKY70 war daher bis heute nicht bekannt (Abbildung 42).

Vor diesem Hintergrund stellt die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Identifizierung von WRKY70 als Interaktionspartner der 30I-8_M1S1-Sequenz einen signifikanten Fortschritt dar. Anhand von Transaktivierungsassays in *Arabidopsis*- und Petersilie-Protoplasten sowie Gelshift-Experimenten mit verschiedenen Kompetitoren konnte gezeigt werden, dass die für die Interaktion nötige Sequenz in 30I-8_M1S1 auf die Nukleotide CGACTTTT begrenzt ist. Diese liegen innerhalb der Pep25-responsiven Region von 30I-8_M1S1. Die entsprechenden Experimente belegen, dass Mutationen außerhalb der CGACTTTT-Sequenz die Transaktivierung sowie die direkte Bindung nicht oder nur wenig beeinflussen. Beispiele hierfür sind die Mutationen 4 und 11 (Abbildung 29 und Abbildung 37). Dahingegen verursachen Mutationen innerhalb dieser Sequenz einen Verlust der Aktivierbarkeit bzw. Bindung durch WRKY70 (Mutationen 10, 12, 13, Abbildung 29, Abbildung 37). Dies belegt die Spezifität der beobachteten Interaktion, da eine unspezifische Bindung nicht durch derart kurze Mutationen (2-4 Nukleotide) verhindert werden sollte. Neben der Tatsache, dass somit zum ersten Mal eine direkte Interaktion von WRKY70 mit einer Zielsequenz gezeigt wurde, ist es interessant, dass die TFBS keine klassische W-Box darstellt. Im Vergleich mit der W-Box-Konsensussequenz TTGACY (Rushton, 1996; Eulgem *et al.*, 2000; Ciolkowski *et al.*, 2008) zeigt sich ein klarer Unterschied. Die hoch konservierten Thymin-Nukleotide an Position 1 und 2 der W-Box finden sich in der WRKY70-TFBS nicht. Dementsprechend liegt der klassische TGAC-Kern der W-Box nicht vor, sondern ist durch CGAC ersetzt. Dem gegenüber stehen die zusätzlichen vier Thymin-Nukleotide an den Positionen 5-8 der WRKY70-TFBS. Diese sind ebenfalls wichtig für die WRKY70-Bindung, da eine Mutation in diesem Bereich zur deutlichen Reduktion der Transaktivierung bzw. zum Verlust der Kompetitionsfähigkeit im Gelshift-Experiment führt (Abbildung 29, Abbildung 37).

Die ebenfalls in der TFBS lokalisierte Mutation 14 wird sehr wahrscheinlich noch von WRKY70 gebunden, da sie in der Lage ist die Interaktion zwischen WRKY70 und 30I-8_M1S1 zu kompetieren (Abbildung 37). Diese Mutation stellt einen Sonderfall dar, da sie die CGACTTTT-Sequenz gezielt in TGACTTTT umwandelt. Dadurch wird die TFBS einer klassischen W-Box angenähert, da sie nun den hoch konservierten TGAC-Kern enthält. Auf Grund der Interaktion von WRKY70 mit dieser Sequenz kann vermutet werden, dass WRKY70 auch klassische W-Boxen binden kann. Diese Hypothese, weitere Varianten der TFBS sowie die Möglichkeit potentielle WRKY70-Zielgene anhand der TFBS zu identifizie-

ren, werden später diskutiert. Auch die Frage, in wieweit die WRKY70-30I-8_M1S1-Interaktion die Pep25- bzw. Pathogen-Responsivität beeinflusst, wird separat erörtert.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass mittels des hier gewählten experimentellen Ansatzes eine neue WRKY-TFBS identifiziert und *in vitro* validiert worden ist. Mögliche Einflüsse des experimentellen Systems wurden bereits im Zusammenhang mit SPL7 diskutiert (6.1). Solche Einflüsse sind zwar nicht völlig auszuschließen, da aber die Spezifität der beobachteten Interaktion relativ hoch ist, erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich um ein artifizielles Phänomen handelt. Weiterhin decken sich die Ergebnisse aus den verschiedenen experimentellen Systemen sehr gut.

6.3. Kann ein WRKY-TF aus Petersilie identifiziert werden, der die Pep25-Responsivität von 30I-8_M1S1 vermittelt?

Sowohl 30I-8_M1S1 als auch 27D-10_M1S2 sind in Petersilie-Protoplasten durch Pep25 induzierbar (Koschmann *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass AtWRKY70 direkt mit der CGACTTTT-Sequenz in 30I-8_M1S1 interagiert (Abbildung 37) und dass die gezielte Mutagenese der TFBS zu einem Verlust der Pep25-Responsivität führt (Abbildung 40). Dies legt nahe, dass die Bindung eines WRKY70-Homologs aus Petersilie für die Pep25-Responsivität in den Protoplasten essentiell ist. Da das Genom von *P. crispum* noch nicht sequenziert ist, kann dieser Faktor nicht eindeutig identifiziert werden. Eine BLAST (blastn) Suche mit der gesamten AtWRKY70-Nukleotidsequenz ergibt nur sehr kurze homologe Abschnitte zu den PcWRKY1 bzw. PcWRKY3-Genen. Allerdings zeigt ein BLAST-Abgleich der Aminosäuresequenz der WRKY-Domäne aus AtWRKY70 gegen translatierte Sequenzen aus *P. crispum* (tblastn Algorithmus), dass die höchste Ähnlichkeit zur WRKY-Domäne von PcWRKY5 besteht (57 % Identität in 60 Positionen). Ebenso wie AtWRKY70 gehört auch PcWRKY5 zur Gruppe III der WRKY-Proteine und trägt ein C2HC-Zinkfinger-Motiv in der WRKY-Domäne (Cormack *et al.*, 2002). Die PcWRKY5-mRNA wird nach Pep25-Behandlung von Petersilie-Zellen bereits nach 30 min unabhängig von der Proteinbiosynthese induziert, erreicht nach 1,5 h das Maximum und ist nach 3 h nicht mehr nachweisbar. Damit gehört dieses Gen wahrscheinlich zu den Genen der frühen Pathogenantwort (Cormack *et al.*, 2002). Es wurde außerdem gezeigt, dass PcWRKY5 zur Transaktivierung von Promotor-Reportergenkonstrukten, die W-Boxen enthalten, in der Lage ist (Cormack *et al.*, 2002). Dass es sich bei PcWRKY5 tatsächlich um das Homolog von AtWRKY70 handelt, welches die Pep25-Responsivität vermittelt, kann auf Grundlage dieser Daten weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Da die zur Verfügung stehenden Se-

quenzdaten aus Petersilie nicht vollständig sind, kann in Petersilie ebenso gut ein weiterer Faktor mit größerer Homologie existieren.

6.4. Sind weitere Faktoren in die Pep25-Responsivität von 30I-8_M1S1 involviert?

Der in 30I-8_M1S1 durch Mutationen eingegrenzte essentielle Bereich für die Pep25-Responsivität beinhaltet die WRKY70-TFBS. Mutationen von nur 2 bp in der TFBS führen zum Verlust der Pep25-Induzierbarkeit (Abbildung 40). Allerdings hat eine weitere Mutation den gleichen Effekt, obwohl diese außerhalb der TFBS liegt (Mutation 7, Abbildung 6). Denkbar ist, dass ein weiterer TF, der in der durch Mutation 7 betroffenen Region bindet, für die Pep25-Induktion mitverantwortlich ist. Ein Beispiel für diese Möglichkeit ist die Regulation des *PR-1a* Promotors in Tabak. Hier haben eine TGA-TFBS sowie die WK₁-Box (TFBS für NtWRKY12) einen synergistischen Effekt auf die Induktion von *PR-1a* durch bakterielle MAMPs (van Verk *et al.*, 2008). Beide *cis*-Elemente befinden sich in räumlicher Nähe zueinander und es konnte eine direkte physikalische Interaktion zwischen NtWRKY12 und TGA2.2 aus Tabak gezeigt werden (van Verk *et al.*, 2011). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch in dem hier untersuchten Fall denkbar: Beispielsweise könnte ein zweiter TF benachbart zur WRKY70-TFBS binden und so die Bindung des WRKY-Faktors begünstigen. Analysen des durch Mutation 7 betroffenen Bereichs in der 30I-8_M1S1-Sequenz mittels STAMP (Mahony und Benos, 2007) ergeben keine signifikanten Hinweise, um welchen zusätzlichen TF es sich handeln könnte (nicht gezeigt). Yeast Two-Hybrid Experimente mit WRKY70 als Bait-Protein könnten Hinweise auf einen möglicherweise beteiligten zweiten TF liefern.

Neben dem Einfluss eines zweiten TF ist es auch denkbar, dass die Nukleotide vor der TFBS einen Einfluss auf die Affinität des WRKY-TF zu der Zielsequenz haben. Es wurde anhand einiger ausgewählter WRKY-TF bereits gezeigt, dass auch Nukleotide außerhalb der eigentlichen W-Box einen Effekt auf die Protein-DNA-Interaktion haben können (Ciolkowski *et al.*, 2008). Es wäre also denkbar, dass die Affinität zur WRKY70-TFBS bei Mutation 7 nicht mehr ausreichend ist, um die Pep25-Responsivität zu bewirken. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu den Kotransfektionsexperimenten sowie zu den Ergebnissen der Gelshift-Experimente: Hier haben Mutationen außerhalb der TFBS keinen oder nur einen geringen Einfluss (Abbildung 29, Abbildung 37). Ein Grund hierfür können die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen sein. In den Kotransfektionsexperimenten stand WRKY70 unter der Kontrolle des starken 35S-Promotors und könnte somit in viel größerer Menge vorliegen als in den Experimenten zur Pep25-Induzierbarkeit. Dies könnte, trotz verringerter Affinität, zur

Transaktivierung des Reportergens führen. Auch in den Gelshift-Experimenten sind die Bindungsbedingungen und das Protein–DNA-Verhältnis sehr wahrscheinlich anders als *in vivo*, was ebenfalls zu der beobachteten Diskrepanz führen könnte. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz ist der potentielle Unterschied zwischen AtWRKY70 und dem unbekannten *P. crispum*-Homolog: In den Induktionsexperimenten mit Pep25 findet keine heterologe Expression von AtWRKY70 statt und das homologe Protein, welches die Responsivität vermittelt, könnte eine leicht abweichende TFBS bzw. Sensitivität für benachbarte Nukleotide haben. Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten nicht eindeutig geschlossen werden, ob ein zweiter TF für die Pep25-Responsivität notwendig ist oder ob es andere Ursachen für die Diskrepanz zwischen WRKY70-TFBS und Pep25-responsiver Region gibt.

6.5. Lässt sich die beobachtete Pathogen-Responsivität in transgenen 30I-8_M1S1-Linien mit der Expression von *WRKY70* korrelieren?

Durch Analyse transgener *Arabidopsis*-Linien, die ein 30I-8_M1S1-GUS-Konstrukt tragen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 30I-8_M1S1 eine leichte Responsivität auf *B. cinerea*-Infektion sowie eine deutlich schwächere Responsivität auf Infektion mit einem avirulenten *Pto* DC3000-Stamm vermittelt (5.3). Daten aus Petersilie-Protoplasten legen nahe, dass WRKY70 direkt für die in diesem System beobachtete Pep25-Responsivität verantwortlich ist (5.12). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Pathogen-Responsivität in transgenen 30I-8_M1S1-Linien ebenfalls durch WRKY70 vermittelt wird. Ein direkter Beweis für diese Hypothese steht allerdings noch aus. Analysen zur Induzierbarkeit von 30I-8_M1S1 in *wrky70*-Knockout-Pflanzen stellen eine Möglichkeit zur Überprüfung dar. Die Reporterexpression in diesen Pflanzen sollte durch *B. cinerea* nicht mehr induzierbar sein. Entsprechende *wrky70*-Knockout-Pflanzen wurden bereits vom *Arabidopsis* Stock Center (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre, Loughborough, England) bezogen, die T-DNA-Insertion verifiziert und homozygote Pflanzen selektiert. Diese können in Zukunft für o.g. Experimente verwendet werden. Eine sinnvolle Ergänzung zu diesen Experimenten wären Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) mit WRKY70. Mittels dieser Analysen könnte eine *in vivo* Interaktion von WRKY70 mit der Zielsequenz gezeigt werden. Diese Zielsequenz wäre entweder der synthetische Promotor in 30I-8_M1S1-GUS-Pflanzen oder der native Promotor, aus dem die 30I-8_M1S1-Sequenz identifiziert wurde (At5g12930). Geeignete T-DNA-Konstrukte, die für WRKY70 mit einem N-terminalen Myc-Tag codieren, wurden bereits in *A. thaliana* transformiert. Das Myc-Tag kann für die Präzipitation von WRKY70 als Protein-DNA-Komplex verwendet werden.

Weitere Hinweise für die Involvierung von WRKY70 in die Induzierbarkeit der 30I-8_M1S1-Sequenz können aber auch ohne zusätzliche Experimente gewonnen werden: Hierzu werden Genexpressionsdaten von *WRKY70* mit der in *Arabidopsis* beobachteten Pathogen-Responsivität von 30I-8_M1S1-Linien korreliert. Zu diesem Zweck wurde, wie auch schon bei SPL7, der *Arabidopsis* eFP-Browser verwendet (Winter *et al.*, 2007). Wie erwartet und bereits diskutiert (s.o.) wird *WRKY70* durch SA-Behandlung der Pflanzen induziert. Der relative Induktionsfaktor beträgt bei 3 h SA-Behandlung laut eFP-Browser 29,44. Bei Pathogeninfektion fallen die Induktionsfaktoren niedriger aus. Durch Infektion mit dem hemibiotrophen Oomyceten *Phytophthora infestans* wird nach 24 h ein Induktionsfaktor von 8,31 erreicht. Im Gegensatz dazu führt das virulente, ebenfalls hemibiotrophe Bakterium *Pto* DC3000 zu keiner Induktion, teilweise sogar zu leichter Repression. Ein avirulenter Stamm dieses Bakteriums (*Pto* DC3000 *avrRPM1*) bewirkt allerdings eine deutliche Induktion der *WRKY70*-Expression (Induktionsfaktor 2,13; 24 h nach Infektion). Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* bewirkt innerhalb der ersten 48 h keine Induktion (Induktionsfaktor 1,2 bzw. 0,84 nach 18 bzw. 48 h).

B. cinerea führte in der vorliegenden Arbeit drei Tage nach Infektion zu einer klar induzierten Reportergenaktivität in transgenen 30I-8_M1S1-Linien. Die Microarray-basierten Daten aus dem eFP-Browser zeigen in den ersten 48 h der Infektion jedoch keine Induktion von *WRKY70*. Ein Zusammenhang mit der Induktion von 30I-8_M1S1 durch *B. cinerea* ist daher nicht eindeutig zu erkennen. Dem widersprechen allerdings Daten von AbuQamar *et al.* (2006), die deutlich gesteigerte *WRKY70*-Expression 24 h nach Infektion (9,2-fach) und weniger starke Expression nach 36 bzw. 60 h zeigen. AbuQamar *et al.* zeigen außerdem, dass *wrky70*-Mutanten eine erhöhte Sensitivität gegenüber *B. cinerea* aufweisen. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass 30I-8_M1S1 durch *B. cinerea* induziert wird und unterstreicht die Bedeutung von *WRKY70* während *B. cinerea*-Infektion. Auch die Expressionsdaten von *WRKY70* während *Pto* DC3000 (virulent bzw. avirulent)-Infektion decken sich gut mit den in transgenen 30I-8_M1S1-Pflanzen erhaltenen Daten: 30I-8_M1S1-Linien zeigen eine schwache Induktion bei Infektion mit dem avirulenten Pathogen und keine Induktion bei Verwendung des virulenten Stammes (Abbildung 14). Die Daten aus dem eFP-Browser zeigen für *WRKY70* ein ähnliches Muster. Auch hier könnte die Anwesenheit bzw. Induktion von *WRKY70* für die Pathogen-Responsivität von 30I-8_M1S1 nötig sein.

Die weiteren aus dem eFP-Browser erhaltenen Daten weisen darauf hin, dass *WRKY70* besonders bei Behandlung mit SA induziert wird. Zukünftige Experimente mit diesem Stimulus könnten also auch zu einer erhöhten Expression in den 30I-8_M1S1-GUS-Pflanzen führen. Vor dem Hintergrund der niedrigen GUS-Aktivitäten in den transgenen Pflanzen wäre dies

besonders interessant. Zusammenfassend ist anzumerken, dass die Microarray-Daten vorsichtig zu interpretieren sind, da große Differenzen zwischen verschiedenen Datensätzen auftreten können, wie am Beispiel der Daten zur *B. cinerea*-Infektion erkennbar ist. Dennoch unterstützen die genannten Daten die Vermutung, dass WRKY70 die Pathogen-Responsivität von 30I-8_M1S1-Linien vermittelt.

Neben den Daten zur Expression während verschiedener Pathogeninfektionen wurden in dieser Arbeit auch Daten zur Grundaktivität der 30I-8_M1S1-Sequenz in transgenen *Arabidopsis*-Linien gesammelt. Es liegt nahe, dass WRKY70 neben der Pathogen-Responsivität auch die Aktivität von 30I-8_M1S1 in Abwesenheit eines Pathogens reguliert. Daher ist ein Vergleich der *WRKY70*-Expression während verschiedener Entwicklungsstadien mit der 30I-8_M1S1-Aktivität interessant. Die 30I-8_M1S1-GUS-Pflanzen zeigen im Keimlingsstadium, aber besonders in den adulten Pflanzen, eine histochemisch nachweisbare GUS-Aktivität. Insgesamt sind die Färbungen sehr heterogen, konzentrieren sich aber in den adulten Pflanzen besonders auf die Blätter (Abbildung 10, Anhang 8 und Anhang 9). Die heterogenen Ergebnisse der GUS-Färbungen können verschiedene Ursachen haben. Neben Positionseffekten, die einen Einfluss auf die Expression des Reportergens haben können, sind zumindest in den in Erde kultivierten Pflanzen Einflüsse von Mikroorganismen nicht auszuschließen. Letztere könnten zur Induktion von *WRKY70* und damit zur Aktivierung von 30I-8_M1S1 führen (s.o.).

Weiterhin lässt sich aber auch die Rolle von WRKY70 als negativer Regulator der Seneszenz, bzw. die kontinuierlich ansteigende *WRKY70*-Expression während der Blattentwicklung (Ülker *et al.*, 2007), mit den oben geschilderten Ergebnissen zur Deckung bringen. Wenn WRKY70 die 30I-8_M1S1-Sequenz tatsächlich direkt reguliert, wäre ein Expressionsmuster zu erwarten, in welchem die adulten Pflanzen bzw. die älteren Blätter die höchste Aktivität aufweisen. Dies ist im Gesamtbild aller 30I-8_M1S1-Linien auch zu beobachten und kann als zusätzlicher Hinweis für eine WRKY70-30I-8_M1S1-Interaktion *in vivo* gewertet werden.

Auch die Bindung von SPL7 an die GTAC-Sequenz in 30I-8_M1S1 könnte einen Einfluss auf die beobachtete Grundaktivität in transgenen Linien haben. Expressionsdaten von SPL7 und dessen Rolle in der Kupferhomöostase (Yamasaki *et al.*, 2009) passen allerdings nicht zu dieser Hypothese. Zusammenfassend ist es daher wahrscheinlich, dass nur WRKY70 für die beobachtete Grundaktivität von 30I-8_M1S1 in den transgenen Linien verantwortlich ist.

6.6. Mögliche Ursachen für die ungewöhnliche Bindungsspezifität von WRKY70

Aus der hier dokumentierten Identifikation der WRKY70-TFBS CGACTTTT in 30I-8_M1S1 kann geschlossen werden, dass WRKY70 sehr wahrscheinlich zu den wenigen WRKY-TF gehört, die auch an eine von der klassischen W-Box abweichende Zielsequenz binden können. Zu diesen gehört der WRKY-Faktor HwWRKY46/SUSIBA2, der an ein nicht genau definiertes Zucker-responsives *cis*-Element aus Gerste sowie an klassische W-Boxen binden kann (Sun *et al.*, 2003). Weiterhin ist bekannt, dass OsWRKY13 sowohl das Pathogen-responsive PRE4-Element (TGCGCTT) in Reis als auch W-Box Sequenzen bindet (Cai *et al.*, 2007). NtWRKY12 aus Tabak hingegen bindet eine WK-Box (TTTTCCAC) aber keine W-Boxen (van Verk *et al.*, 2008). Die beiden zuerst genannten Faktoren tragen das sehr häufige WRKYGQK-Motiv in der Aminosäuresequenz ihrer DNA-bindenden Domänen, während NtWRKY12 die weniger häufige WRKYGKK-Sequenz enthält. Die Hypothese, dass einzig der Austausch von Lysin (K) zu Glutamin (Q) verantwortlich für die veränderte Spezifität ist, konnte im Fall von NtWRKY12 jedoch nur teilweise bestätigt werden: Zwar verliert NtWRKY12 nach Modifikation der WRKYGKK-Sequenz zu WRKYGQK bzw. WRKYGEK (einer weiteren Variante der WRKY-Domäne) die Affinität zur WK-Box, allerdings führt das nicht zur Bindung der klassischen W-Box. Folglich müssen neben dem Glutamin- bzw. Lysin-Rest auch andere Aminosäuren eine Rolle für die DNA-Spezifität spielen (van Verk *et al.*, 2008). Neben den oben besprochenen Faktoren konnte für AtWRKY26, 38 und 43 gezeigt werden, dass zumindest einige Punktmutationen in der W-Box toleriert werden können, die Affinität dieser Faktoren zur klassischen W-Box aber größer ist (Ciolkowski *et al.*, 2008).

AtWRKY70 trägt eine klassische WRKYGQK-Sequenz in der DNA-bindenden Domäne. Die WRKY-Domänen aller Klasse III WRKY-TF aus *Arabidopsis* wurden bereits identifiziert (Zhang und Wang, 2005, Supplementary Data). Um zu untersuchen, ob die WRKY-Domäne von WRKY70 Unterschiede zu anderen Klasse III Mitgliedern aufweist, wurde mittels Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/tools) ein Alignment durchgeführt, in welchem alle WRKY-Domänen dieser Klasse aus *Arabidopsis* berücksichtigt sind. Mögliche Abweichungen könnten die ungewöhnliche Bindungsspezifität von WRKY70 erklären. Das Ergebnis zeigt, dass neben der WRKYGQK-Sequenz auch alle anderen vollständig konservierten Aminosäuren der Klasse III WRKY-Domäne in WRKY70 unverändert vorliegen (Anhang 29). Anhand des Alignments wurde eine Konsensussequenz erstellt, in welcher alle Aminosäuren, die in mehr als 80 % der Klasse III Domänen an einer bestimmten Position vorkommen, eingetragen sind. Auch

hier zeigt sich nur an einer Position eine Abweichung zwischen WRKY70 und den übrigen WRKY-Domänen (Anhang 30). Der an Position 30 in 12 von 14 Domänen konservierte Tyrosin-Rest (Y) ist in WRKY70 und dem mit WRKY70 am nächsten verwandten WRKY54 gegen Phenylalanin (F) substituiert. Dies könnte einen Einfluss auf die Bindungsspezifität haben, bedarf aber experimenteller Untersuchungen. Allerdings haben Strukturanalysen eines Komplexes aus der C-terminalen AtWRKY4-Domäne und einer W-Box gezeigt, dass die Interaktion zwischen einer TTTGACC-Sequenz und der WRKY-Domäne durch direkten Kontakt der Aminosäuren RKYGQK aus der WRKYGQK-Sequenz mit der W-Box Sequenz resultiert (Yamasaki *et al.*, 2012). Die gesamte Kontaktfläche - inklusive der Interaktionen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat - beläuft sich dabei auf eine Länge von 8 bp. Besonders apolare Interaktionen zwischen den drei Thymin-Nukleotiden und den Aminosäuren aus der WRKYGQK-Sequenz sind hierfür wichtig (Yamasaki *et al.*, 2012). Für weitere fünf Aminosäuren aus dem entsprechenden Komplex wurden Interaktionen (Wasserstoffbrückenbindung bzw. elektrostatische Anziehung) mit Phosphatgruppen der DNA gezeigt (Yamasaki *et al.*, 2012). Auf Grundlage dieser Daten lassen sich keine klaren Vermutungen zur Ursache der abweichenden Bindungsspezifität von WRKY70 ableiten. Dabei ist allerdings zu beachten, dass WRKY70 einer anderen Klasse von WRKY-Proteinen angehört als WRKY4 (Klasse III statt Klasse I) und die Bindungssituation daher möglicherweise abweichend ist. Zusammenfassend ist also anzunehmen, dass die DNA-Bindung bei WRKY70 vermutlich durch weitere, nicht näher definierte Strukturmerkmale möglicherweise außerhalb der WRKY-Domäne dahingehend beeinflusst wird, dass die CGACTTTT-Sequenz gebunden wird. Da die vorliegenden Daten aber auch auf eine Interaktion mit klassischen W-Boxen hinweisen, scheint nachwievor die WRKY-Domäne ausschlaggebend für die Bindung zu sein. Die oben erläuterte Bedeutung der Thymin-Basen einer W-Box für die Interaktion mit der WRKY-Domäne passt zu der in dieser Arbeit identifizierten TFBS: Hier finden sich vier Thymin-Basen, welche für die WRKY70-Bindung essentiell sind. Auch die Länge der identifizierten TFBS (CGCATTTC) passt mit acht Nukleotiden zum oben beschriebenen Komplex.

Um Informationen über bekannte Protein-DNA-Komplexe, die eine ähnliche DNA-Sequenz wie die WRKY70-TFBS aufweisen, zu erhalten, wurde das Online-Tool „3D-footprint“ verwendet (Contreras-Moreira, 2010). Dieses Tool erlaubt es, ausgehend von einer DNA-Sequenz, eine Datenbank mit kristallographischen Daten zu durchsuchen. Das Programm sucht dabei nach Protein-DNA-Komplexen, in denen eine ähnliche Sequenz gebunden wird. Dadurch können Hinweise auf die Art des möglicherweise an die fragliche Sequenz bindenden TF erhalten werden. Eine Datenbank-Suche mit der CGACTTTT-Sequenz aus 30I-8_M1S1 ergab allerdings keine Treffer, die mit WRKY70 oder WRKY70-ähnlichen Proteinen in Verbindung stehen (Daten nicht gezeigt). Der Datenbanktreffer mit dem besten

E-Wert ist „I-Crel“ (Endonuklease aus *Chlamydomonas reinhardtii*). Dieses Protein zeigt keine relevanten Ähnlichkeiten zu WRKY-Proteinen oder anderen TF aus *Arabidopsis*. Es lassen sich aus diesen Ergebnissen daher keine weiteren Hinweise auf die Ursache der WRKY70-Bindungsspezifität ableiten.

Ausgehend von der DNA-bindenden Domäne von WRKY70 wurde auch der umgekehrte Weg in der „3D-footprint“ Analyse gegangen: D.h. mit der Sequenz der WRKY-Domäne wurden ähnliche Proteine bzw. Protein-DNA-Komplexe gesucht. Auch hier ergaben sich aber keinerlei weiterführende Treffer, da ausschließlich der bereits oben beschriebene AtWRKY4-W-Box-Komplex in der Datenbank identifiziert werden konnte. Da sich alle für die Bindung relevanten Aminosäuren in AtWRKY4 und AtWRKY70 an gleicher Position befinden, ergibt auch die nachfolgende Analyse mit dem Programm „TFmodeller“ (Contreiras-Moreira *et al.*, 2007) keine weiterführenden Erkenntnisse. Das Programm prognostiziert ausgehend von einem Alignment der beiden WRKY-Domänen für AtWRKY70 die gleiche TFBS, die schon für AtWRKY4 beschrieben wurde (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend ergeben sich aus den durchgeführten Datenbankrecherchen also keine neuen Erkenntnisse, so dass weiterhin unklar ist, wodurch die veränderte DNA-Spezifität von WRKY70 ausgelöst wird.

Ein möglicher experimenteller Ansatz zu Klärung dieser Frage wäre es, verschiedene Versionen der WRKY-Domäne aus WRKY70 zu erstellen und für Gelshift-Experimente zu nutzen. Dabei wäre es denkbar, zunächst Gruppen von z.B. zehn Aminosäuren (AS) gegen entsprechende AS aus einem Gruppe III WRKY-Protein zu tauschen und zu untersuchen, ob die WRKY70-TFBS immer noch gebunden wird. Das WRKY-Protein, aus dem die AS-Sequenzen stammen, sollte dabei so gewählt werden, dass es zwar die W-Box, nicht aber die WRKY70-TFBS bindet. Ein möglicher Kandidat wäre WRKY54, der am nächsten mit WRKY70 verwandte TF. Die Bindung von WRKY54 an die WRKY70-TFBS müsste allerdings zunächst noch ausgeschlossen werden. Mit dieser Strategie könnte möglicherweise eine Version der WRKY-Domäne aus WRKY70 erstellt werden, welche zwar noch an die W-Box, nicht aber an die hier definierte TFBS bindet. Damit könnten die für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren eingegrenzt werden. Ein ähnlicher Ansatz, bei dem einzelne Aminosäuren substituiert wurden, hat im Fall von AtWRKY11 zur Identifizierung einiger Aminosäuren außerhalb der WRKYGQK-Sequenz geführt, welche die Bindung an eine W-Box beeinflussen. Hierbei konnten auch Aminosäuren außerhalb der eigentlichen WRKY-Domäne identifiziert werden, welche einen positiven Einfluss auf die Interaktion haben (Ciolkowski *et al.*, 2008).

6.7. Anhand von Bindungsstudien kann eine Konsensussequenz für die WRKY70-TFBS postuliert werden

Mutationsanalysen in Protoplasten und die Gelshift-Experimente mit WRKY70, 30I-8_M1S1 und verschiedenen Kompetitorsequenzen aus Motivgruppe 27 legen den Schluss nahe, dass auch 30I-8_M1S1-ähnliche Sequenzen von WRKY70 gebunden werden können. Zumindest das erste Nukleotid der CGACTTTT-Sequenz ist variabel. Mutation 14, welche an Position 1 ein Thymin anstelle des Cytosins trägt, kann in Protoplasten noch durch WRKY70 induziert werden und kompetiert die 30I-8_M1S1-WRKY70-Interaktion im Gelshift-Experiment fast vollständig (Abbildung 37). Die in dieser Mutation vorliegende Sequenz ähnelt einer klassischen W-Box, da sie den invarianten TGAC-Kern enthält (**TGACTTTT**). Ebenso werden die 30I-8_M1S1-ähnlichen Sequenzen 30I-8_M1S2 (21) und 30I-8_M1S3 (22) offensichtlich noch durch WRKY70 gebunden (Abbildung 38). Auch diese tragen an der entsprechenden Stelle ein Thymin. Durch die Nukleotide weiter upstream ergibt sich in diesen beiden Fällen sogar eine vollständige W-Box (**TTTGACTTTT**). Aus diesen Ergebnissen kann indirekt gefolgert werden, dass WRKY70 auch an klassische W-Boxen binden kann. Da sich die Kernsequenz benachbarten Sequenzen in 30I-8_M1S2/S3 jedoch von denen in 30I-8_M1S1 unterscheiden, kann ein Einfluss der flankierenden Sequenzen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. 30I-8_M1S3 trägt beispielsweise noch eine zusätzliche W-Box hinter der Kernsequenz (Abbildung 4). Auch Sequenz 30H-8_M1S2 ist in der Lage, die Interaktion von 30I-8_M1S1 mit WRKY70 zu kompetieren, allerdings nur sehr schwach (Abbildung 38). Da diese Sequenz an der ersten Position der Kernsequenz ein Guanin statt eines Cytosins und an der letzten Position ein Cytosin statt eines Thymins trägt, ist möglicherweise auch die letzte Position variabel. Da 30H-8_M1S2 eine W-Box (TTGACC) in der 3'-Region und eine W-Box ähnliche Sequenz (TGACC, revers komplementärer Strang) in der 5'-Region trägt (Abbildung 4), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Interaktion durch diese hervorgerufen wird. Die Interaktion zwischen WRKY70 und 30H-8_M1S2 wird daher in der weiteren Diskussion ausgeklammert. Alle übrigen in den Gelshift-Experimenten eingesetzten Kompetitoren tragen an erster Position der TFBS-Region ein Adenin und sind nicht in der Lage die WRKY70-Bindung zu kompetieren. Auf Grundlage der Gelshift-Experimente kann daher die Konsensussequenz YGACTTTT (Y=C/T) für die TFBS postuliert werden (Abbildung 39). Die YGACTTTT-Sequenz zeigt Ähnlichkeit zu einer auf Grund von Bindungsstudien vorgeschlagenen erweiterten W-Box-Konsensussequenz TWGTTGACYWWWW (W=A/T, Abbildung 43, Ciolkowski *et al.*, 2008). Die Variabilität hinsichtlich der ersten Position im TGAC-Kern ist allerdings nur in der WRKY70-TFBS zu finden und scheint daher eine Besonderheit darzustellen. Hinsichtlich der hier beschriebenen Konsensussequenz der WRKY70-TFBS muss

beachtet werden, dass bisher nur die Interaktion mit CGACTTTT (aus 30I-8_M1S1) direkt gezeigt wurde. Alle anderen Interaktionen wurden nur indirekt durch Konkurrenzexperimente belegt. Da die Konkurrenten in 1000-fach molarem Überschuss verwendet wurden, kann keine Aussage über die mögliche Präferenz gegenüber bestimmten Basen an einer Position gemacht werden. Ob WRKY70 also die neue TFBS bevorzugt bindet bzw. ob es sich im Vergleich zur klassischen W-Box mit TGAC-Kern um eine stärkere Affinität handelt, ist unklar. Lediglich die Kofunktionsexperimente liefern hier einen Hinweis: Mutation 14, die eine TGACTTTT-Sequenz enthält, wird nicht wesentlich stärker oder schwächer durch WRKY70 aktiviert (Abbildung 29). Dies spricht dafür, dass zumindest an der ersten Position das Cytosin gegenüber einem Thymin nicht bevorzugt oder benachteiligt wird.



Abbildung 43: Postuliertes allgemeines Sequenzlogo für WRKY-TFBS

Übernommen aus Ciolkowski *et al.* (2008).

Um die offenen Fragen bezüglich der Variabilität einzelner Positionen in der TFBS zu klären, kommen verschiedene Strategien in Frage. Weitere Gelshift-Experimente mit verschiedenen Punktmutationen innerhalb und außerhalb der TFBS könnten aufschlussreich sein. Hierbei besteht aber das Problem der relativ schlechten Quantifizierbarkeit. Es gibt allerdings auch Protein-DNA-Interaktionsassays, wie z.B. DPI-ELISA, in denen qualitative Daten gewonnen werden können (Brand *et al.*, 2010). Eine weitere und wahrscheinlich effizientere Methode wäre die völlige Neubestimmung der TFBS mittels RBSS (Random Binding Site Selection) bzw. SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Bei dieser Methode wird ein Gemisch von Oligonukleotiden, welches jede denkbare Sequenz enthält, mit dem rekombinanten Protein inkubiert, ungebundene Oligonukleotide entfernt und die gebundenen amplifiziert. Die Prozedur wird mit den amplifizierten Oligonukleotiden mehrfach wiederholt, wobei die präferierte TFBS in jeder Runde angereichert wird. Diese kann mittels Klonierung und Sequenzierung bestimmt werden (Tuerk und Gold, 1990). Dabei entstehen in der Regel verschiedene TFBS-Varianten, die die Häufigkeit eines Nukleotids an einer gegebenen Position widerspiegeln.

6.8. Welche Bedeutung hat die WRKY70-TFBS *in vivo*?

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, neben der Interaktion zwischen WRKY70 und 30l-8_M1S1, die Tatsache, dass WRKY70 eine TFBS (CGACTTTT bzw. YGACTTTT) bindet, die nicht der klassischen W-Box entspricht. Die Definition dieser TFBS bzw. Konsensussequenz wurde bereits diskutiert. Da keine *in vivo* Daten über die tatsächlichen Affinität von WRKY70 zu der neuen TFBS vorliegen, ergibt sich die Frage nach der biologischen Signifikanz der Ergebnisse bzw. der Definition möglicher WRKY70-Zielgene. Stellt die TFBS also tatsächlich ein Promotorelement dar, mit dem sich mögliche WRKY70-Zielgene identifizieren lassen?

Ein experimenteller Ansatz zur Überprüfung dieser Frage im Rahmen möglicher Folgeprojekte wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit bereits vorbereitet. Zusätzlich zu bereits vorhandenen *wrky70*-Knockout-Pflanzen wurden *WRKY70*-Überexpressionslinien erstellt. Überexpressions- bzw. Knockout-Linien von *WRKY70* wurden auch in der Vergangenheit erfolgreich analysiert (Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Ülker *et al.*, 2007). Die entsprechenden Linien können in Zukunft auf veränderte Genexpression der möglichen hier identifizierten WRKY70-Zielgene untersucht werden. Hierzu würden sich qPCR-Experimente anbieten. Die Auswahl von Kandidatengenen könnte anhand der TFBS-Sequenz erfolgen: Gene, die diese Sequenz in Ihrem Promotor tragen, sind potentiell durch WRKY70 reguliert. Eine weiterführende Analyse wäre mit ChIP- bzw. ChIP-Seq-Experimenten möglich. Hier könnten in einem Experiment direkte WRKY70-Zielgene identifiziert werden und gleichzeitig Informationen über die Affinität zu der neuen TFBS gesammelt werden. Ist diese in den durch ChIP angereicherten Sequenzen häufig vertreten, wäre das ein klarer Hinweis auf die Affinität von WRKY70 zur TFBS.

Neben den erläuterten experimentellen Analysen kann aber auch eine Kombination von Genexpressionsdaten und bioinformatischen Analysen erste Hinweise auf die *in vivo* Bedeutung der TFBS liefern. Li *et al.* haben mit *WRKY70*-Überexpressionslinien bzw. Antisense-Suppressionslinien Microarray-Analysen durchgeführt (Li *et al.*, 2004). Von mehr als 4.500 untersuchten Genen zeigten 331 eine differentielle Expression (mehr als zweifach induziert/reprimiert) im Vergleich zu Kontrollpflanzen. In 42 dieser Gene war der Induktionsfaktor größer als 2,5 und zusätzlich bereits ein Bezug zur Pathogenabwehr bekannt. Li *et al.* teilen diese Gene in 24 positiv regulierte (hochreguliert in *WRKY70*-Überexpressionslinien) und die restlichen negativ regulierten Gene ein. Die negativ regulierten Gene sind entweder in den Suppressionslinien hochreguliert bzw. den Überexpressionslinien reprimiert (Li *et al.*, 2004). Das Gen, aus dessen Promotor die 30l-8_M1S1-Sequenz stammt (At5g12930), ist in

den 331 differentiell regulierten Genen nicht enthalten. Ob dieses Gen in den Microarray-Analysen berücksichtigt wurde, ist nicht publiziert.

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass WRKY70 als Aktivator fungiert, sind die reprimierten Gen-Gruppen vermutlich indirekt durch WRKY70 reguliert (z.B. durch Induzierung eines Repressors), während die induzierten Gene sehr wahrscheinlich zumindest zum Teil direkt durch WRKY70 reguliert werden. Im Kontext dieser Annahme und auf Grundlage der Daten von Li *et al.* wurden diejenigen 100 Gene identifiziert, die in der Überexpressionsline am stärksten induziert bzw. reprimiert sind. Mit dem Tool POBO (Kankainen und Holm, 2004) wurde das Auftreten der YGACTTTT-Konsensussequenz in beiden Clustern analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die aktivierten Gene im Vergleich zum Hintergrundmodell eine signifikant höhere Anzahl an YGACTTTT-Sequenzen pro Promotor tragen. Entgegengesetzt finden sich in den 100 reprimierten Genen signifikant weniger dieser Sequenzen als im Hintergrundmodell (Abbildung 41). Dementsprechend ist auch der Unterschied zwischen beiden Clustern signifikant (5.13). Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine Rolle der Konsensussequenz in der Regulation der WRKY70-responsiven Gene darstellen. Es ist denkbar, dass es zur direkten Aktivierung der Gene mit der TFBS-Sequenz im Promotor kommt und dass das Set der reprimierten Gene indirekt durch WRKY70 reguliert wird.

Ähnliche Analysen wurden mit den gleichen Microarray-Daten (ebenfalls mittels POBO) bereits früher durchgeführt, allerdings stand dort keine *in vitro* bestätigte TFBS für WRKY70 zu Verfügung (Kankainen und Holm, 2004). Die Autoren dieser Studie haben eine TTGACMB (M=C/A; B=C/T/G) Sequenz gefunden, welche in WRKY70-induzierten Genen angereichert ist und eine TTGACMA-Sequenz, welche in reprimierten Genen angereichert ist. Eine Hypothese der Autoren besagt, dass die zuletzt genannte Sequenz durch das Adenin in der letzten Position eine WRKY70-Bindung blockiert und so zur geringeren Expression beiträgt (Kankainen und Holm, 2004). Experimentelle Evidenz für diese Vermutung gibt es allerdings nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* bestätigte WRKY70-TFBS identifiziert, welche sowohl die Repression als auch die Aktivierung der entsprechenden Gene erklären kann. Die Aktivierung erfolgt vermutlich direkt, da es sich bei WRKY70 offensichtlich um einen transkriptionellen Aktivator handelt (5.5) und die TFBS in den WRKY70-induzierten Genen angereichert ist (5.13). Die reprimierten Gene tragen die WRKY70-TFBS seltener, werden also vermutlich nicht direkt, sondern indirekt, z.B. über die Aktivierung von Repressoren, durch WRKY70 reprimiert. Die im Zuge der Promotor-Analysen erhaltenen Daten können für zukünftige Experimente als Grundlage für die Auswahl potentieller WRKY70-Zielgene dienen. Die Gene mit der YGACTTTT-Konsensussequenz könnten in ChIP-Experimenten auf direkte Regulation durch WRKY70 analysiert werden. Der WRKY30-Promotor (At5g24110)

stellt in diesem Zusammenhang einen besonders interessanten Kandidaten dar. *WRKY30* kann, wie bereits erwähnt, direkt mit *WRKY70* interagieren (Besseau *et al.*, 2012). Weiterhin weist der *WRKY30*-Promotor die zur Gruppe 27 gehörende Sequenz 30I-8_M1S3 auf (Koschmann *et al.*, 2012). Diese enthält eine TGACTTTT-Kernsequenz und wird wahrscheinlich direkt durch *WRKY70* gebunden (6.7, Abbildung 38). Auch die *cis*-Sequenz 30H-8_M1S2, welche nur sehr schwach von *WRKY70* gebunden wird (6.7, Abbildung 38), stammt ebenfalls aus dem *WRKY30*-Promotor (Koschmann *et al.*, 2012). *WRKY30* ist in den Expressionsdaten von Li *et al.* (Li *et al.*, 2004) nicht enthalten, sodass unklar ist, ob dieses Gen bei *WRKY70*-Überexpression differentiell exprimiert wird. Es ist allerdings bekannt, dass *WRKY30* ähnlich wie *WRKY70*, während der Seneszenz exprimiert wird. Die Expressionsprofile von *WRKY70* und *WRKY30* zeigen dabei einen leicht unterschiedlichen Verlauf. *WRKY70* wird während der Blattentwicklung kontinuierlich immer stärker exprimiert, während die *WRKY30*-Expression erst mit Einsetzen der Seneszenz stark ansteigt (Besseau *et al.*, 2012). Denkbar wäre ein Regulationsmechanismus, in dem *WRKY70* die Expression von *WRKY30* stimuliert, die Proteine *WRKY70* und *WRKY30* dann direkt interagieren und so die Seneszenz kontrollieren. Ein erster Schritt zur Überprüfung dieser Vermutung wären Transaktivierungsexperimente in Protoplasten. Sollte *WRKY70* wie vermutet in der Lage sein die 30I-8_M1S3-Sequenz zu aktivieren, wäre auch eine Regulation des *WRKY30*-Promotors *in vivo* möglich. Zusammenfassend liefern die durchgeführten Analysen Hinweise darauf, dass die *WRKY70*-TFBS tatsächlich ein regulatorisches Element in *WRKY70*-responsiven Genen darstellt.

6.9. Sind die potentiellen *WRKY70*-Zielgene Pathogen-responsiv?

Wie bereits diskutiert, legen die in dieser Arbeit erhaltenen Daten nahe, dass *WRKY70* über die YGACTTTT-Konsensussequenz die Expression seiner Zielgene reguliert (6.8). Vor diesem Hintergrund ist die Frage interessant, ob die potentiellen Zielgene während der Pathogenantwort induziert sind. Dies wäre auf Grund der Funktion von *WRKY70* in der Pathogenabwehr zu erwarten. Zur Beantwortung dieser Frage lassen sich Microarray-Daten aus Pathogen-infizierten *A. thaliana* nutzen. Das Tool „*in-silico* Expression Analysis“ der Datenbank PathoPlant (Bülow *et al.*, 2004; Bülow *et al.*, 2007) erlaubt es, die Genexpressionsdaten von Genen, welche eine bestimmte *cis*-Sequenz in ihrer Promotorregion tragen, zu analysieren. Dabei werden diejenigen Stimuli identifiziert, die die Genexpression der betreffenden Gene im Durchschnitt am stärksten beeinflussen. Für die *WRKY70*-TFBS wäre also eine Korrelation mit Pathogenen bzw. MAMPs interessant. Eine Analyse der Konsensussequenz YGACTTTT der *WRKY70*-TFBS ist mit dem „*in-silico* Expression Analysis“ Tool nicht mög-

lich, da keine degenerierten Positionen akzeptiert werden. Es können daher nur Analysen mit den einzelnen Varianten, die sich aus der Konsensussequenz ergeben, durchgeführt werden. Die Untersuchung einer TGACTTTT-Sequenz ist auf Grund einer zu hohen Anzahl von Genen mit dieser Sequenz allerdings nicht möglich. Eine online durchgeführte Analyse (www.pathoplant.de) der Gene, die die CGACTTTT-Sequenz aus 30I-8_M1S1 innerhalb einer 500 bp Promotorsequenz tragen, führt zur Identifikation von 335 Genen (Einstellungen: 500 bp Promotorregion, Ausschluss von miRNA- und smallRNA-regulierten Genen). Diese Ergebnisse beruhen auf den öffentlich zugänglichen Daten in der PathoPlant-Datenbank und können jederzeit reproduziert werden. Die Expressionsdaten der identifizierten Gene zeigen, dass die beiden höchsten mittleren Induktionsfaktoren, die gleichzeitig auch die besten p-Werte haben, durch *B. cinerea* (48 hpi, Induktionsfaktor = 1,245, p-Wert = $1,4 \times 10^{-9}$) bzw. *Pto avrRPM1* (24 hpi, Induktionsfaktor 1,22, p-Wert = $7,8 \times 10^{-11}$)-Infektion erreicht werden. Dies bedeutet, dass die Gene, welche die GACTTTT-Sequenz in ihrem Promotor tragen, im Mittel durch diese beiden Pathogene um einen Faktor von ca. 1,2 hochreguliert werden. Die experimentellen Daten, die mit 30I-8_M1S1-GUS-Linien erhalten wurden, passen gut zu dieser Analyse, da auch hier eine Responsivität gegenüber *B. cinerea* sowie *Pto* DC3000 *avrRPM1* beobachtet wurde (5.3). Die Genexpressionsdaten weiterer Stimuli, wie z.B. *Pto* DC3000 (virulent), zeigen z.T. auch eine leichte Induktion, allerdings sind die p-Werte in diesen Fällen deutlich höher, d.h. das Signifikanzniveau gering (nicht gezeigt). Insgesamt deutet diese Analyse darauf hin, dass die WRKY70-TFBS eine Rolle in der Pathogen-Responsivität potentieller WRKY70-Zielgene spielt. Experimentelle Analysen könnten dabei helfen, diese Vermutung zu bestätigen. Eine einfache Möglichkeit erste Hinweise zu erhalten, wäre die Analyse der Expression potentieller WRKY70-Zielgene in *wrky70*-Mutanten während einer *B. cinerea*-Infektion. Sollten die Kandidatengene im Vergleich zum Wildtyp in den Mutanten schwächer oder gar nicht mehr induziert sein, wäre dies ein Hinweis auf eine Regulation durch WRKY70. Die bereits mehrfach angesprochenen ChIP-Experimente würden weiterführende Analysen ermöglichen.

6.10. Wie kann die Transaktivierung von 27D-10_M1S2 durch WRKY70 erklärt werden?

Die Pep25-responsive Region in den Sequenzen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 ist zwar nicht identisch, überlappt aber um zehn Nukleotide. Diese umspannen die in Gruppe 27 definierte GACTTTT-Kernsequenz bzw. die Region in 30I-8_M1S1, in der die WRKY70-TFBS definiert wurde (Abbildung 9, Abbildung 40). In diesem Bereich unterscheiden sich die Sequenzen nur um zwei Nukleotide. Auf Grund dieser Ähnlichkeit und der Tatsache, dass

WRKY70 im Protoplasten-System in der Lage ist die 27D-10_M1S2-Sequenz zu transaktivieren, lag die Vermutung nahe, dass WRKY70 auch mit 27D-10_M1S2 direkt interagiert.

Eine Mutagenese von 27D-10_M1S2 und anschließende Kotransfektion mit WRKY70 in *Petersilie*-Protoplasten hat diese Vermutung aber nicht bestätigen können. Weder im zentralen Bereich, in dem die größte Ähnlichkeit zu 30I-8_M1S1 besteht, noch im 5' Bereich, in dem eine W-Box ähnliche Sequenz auftritt, konnte eine TFBS definiert werden. Zwar können zwei längere Mutationen in diesen Bereichen die Transaktivierbarkeit zumindest teilweise aufheben, allerdings führen kleinere Mutationen im gleichen Bereich nicht mehr zum völligen Verlust der Induzierbarkeit durch WRKY70 (Abbildung 30 und Abbildung 31). Die für die Transaktivierung notwendigen Nukleotide liegen folglich in einem 16 bp langen Bereich, sind allerdings nicht alle essentiell.

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass in 27D-10_M1S2 evtl. eine komplexere TFBS bzw. ein kombinatorisches Element vorliegt. Wie die Gelshift-Experimente indirekt zeigen, wird dieses wahrscheinlich nicht direkt von WRKY70 gebunden (Abbildung 38). Dies korreliert auch mit den Ergebnissen des Yeast One-Hybrid-Screenings, da WRKY70 nicht mit 27D-10_M1S2 sondern nur mit 30I-8_M1S1 identifiziert wurde. Möglicherweise kommt es daher zur Bindung von einem oder mehreren durch WRKY70 aktivierten TF an 27D-10_M1S2. Diese Bindung könnte zur beobachteten Transaktivierung durch WRKY70-Überexpression führen. Eine Analyse der 27D-10_M1S2-Sequenz mittels STAMP (Mahony und Benos, 2007) ergibt allerdings keine Hinweise auf mögliche TFBS in den in Frage kommenden Sequenzabschnitten (Daten nicht gezeigt). Auch die entsprechende Analyse der gesamten 27D-10_M1S2-Sequenz erbringt keine neuen Erkenntnisse. Zwar liegt innerhalb der Pep25-responsiven Region eine T-Box vor (ACTTTG, revers komplementärer Strang), diese ist allerdings als Licht-responsiv beschrieben (Chan *et al.*, 2001). Viele Gene, die an der Photosynthese beteiligt sind, tragen u.a. T-Boxen in ihrem Promotor und werden während biotischem Stress reprimiert (Bilgin *et al.*, 2010). Eine Funktion der T-Box erscheint vor dem Hintergrund der Pathogen-Responsivität von 27D-10_M1S2 daher sehr unwahrscheinlich. Da auch das Yeast One-Hybrid-Screening mit 27D-10_M1S2 außer dem falschen positiven TF JAG keinerlei mögliche Interaktoren identifiziert hat, ist eine Hypothese, um welchen TF es sich handeln könnte, schwer aufzustellen. Zur experimentellen Klärung dieser Frage wäre es vermutlich am hilfreichsten, die für die WRKY70-vermittelte Transaktivierung essentiellen Nukleotide zu identifizieren. Da einzelne Mutationen weniger Nukleotide aber nicht ausreichend sind, um die Aktivierung aufzuheben, wäre es möglich, Kombinationen von kurzen Mutationen zu analysieren. Beispielsweise würden sich hier Mutation 10 und 14 anbieten, da diese als einzelne Mutationen die Transaktivierung zumindest leicht negativ beein-

flussen (Abbildung 30 und Abbildung 31). Denkbar wäre, dass eine Kombination beider Mutationen zu einem deutlicheren Effekt führt.

27D-10_M1S2 und 30I-8_M1S1 weisen in Protoplasten sowie in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen eine ähnliche Pep25- bzw. Pathogen-Responsivität auf und WRKY70 kann 27D-10_M1S2 indirekt transaktivieren. Es liegt daher nahe, dass der 27D-10_M1S2-Aktivator direkt von WRKY70 induziert wird. Weiterhin wurden sowohl 30I-8_M1S1 als auch 27D-10_M1S2 in der von Koschmann *et al.* durchgeführten bioinformatischen Analyse in koregulierten Genen identifiziert, welche responsiv auf *E. orontii* und das MAMP NPP1 sind (Koschmann *et al.*, 2012). Auch dies legt nahe, dass beide Sequenzen Teil des gleichen regulatorischen Netzwerkes sind. Die indirekte Aktivierung durch WRKY70 bedeutet gleichzeitig, dass die Ähnlichkeit der Kernsequenz bzw. des Pep25-responsiven Bereiches zwischen 30I-8_M1S1 und 27D-10_M1S2 keine direkte biologische Relevanz hat. Auch wenn die Sequenzen durch die gleichen Stimuli induziert werden, sind daran unterschiedliche Regulatoren beteiligt.

Wie in Abschnitt 6.8 diskutiert wurde, ist es möglich, potentielle WRKY70-Zielgene anhand der in dieser Arbeit definierten TFBS zu identifizieren. Eine darauf folgende experimentelle Validierung der Zielgene würde die Auswahl möglicher TF, die durch WRKY70 induziert werden und anschließend 27D-10_M1S2 aktivieren, ermöglichen. TF-Kandidaten könnten in Transaktivierungsexperimenten validiert werden. Zusammenfassend kann zum jetzigen Zeitpunkt aber keine fundierte Vermutung über den 27D-10_M1S2-aktivierenden Faktor angestellt werden.

6.11. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor WRKY70 *in vitro* spezifisch an eine CGACTTTT-Sequenz in der bioinformatisch identifizierten *cis*-Sequenz 30I-8_M1S1 bindet. Diese Sequenz ist sowohl in Petersilie-Protoplasten als auch in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen Pep25- bzw. Pathogen-responsiv. Die WRKY70-TFBS ist für diese Responsivität essentiell. Es ist bekannt, dass WRKY70 eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr spielt (Li *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Ülker *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang scheint es wahrscheinlich, dass WRKY70 30I-8_M1S1 trotz des Fehlens einer W-Box auch *in vivo* bindet und so die Pathogen-Responsivität vermittelt. Korrelationen von WRKY70-Expressionsdaten mit den beobachteten Expressionsmustern der 30I-8_M1S1-Sequenz in transgenen Pflanzen unterstützen diese Schlussfolge-

rung. Damit gehört WRKY70 sehr wahrscheinlich zu den wenigen WRKY-TF, die eine andere TFBS als eine klassische W-Box binden können.

Weitere Gelshift-Experimente legen nahe, dass die CGACTTTT-Sequenz Teil einer YGACTTTT-Konsensussequenz ist, welche die WRKY70-TFBS beschreibt. Bioinformatische Analysen liefern erste Hinweise auf die Bedeutsamkeit dieser Sequenz als regulatorisches Element. Im Hinblick auf die Identifizierung möglicher WRKY70-Zielgene, kann die TFBS daher sehr hilfreich sein. Vor dem Hintergrund, dass WRKY70 in der Pathogenantwort eine zentrale Position einnimmt, ist es von großem Interesse, diese in Zukunft zu identifizieren. Eine Auswahl von Kandidaten-Genen kann anhand der hier definierten TFBS getroffen werden.

Die durchgeführten Analysen zeigen auch, dass die bei Koschmann *et al.* (2012) definierte Kernsequenz der Motivgruppe 27 (GACTTTT) offensichtlich in einigen der Gruppe 27-Sequenzen als Teil der WRKY70-TFBS dient. Anhand der Sequenz 27D-10_M1S2 wird aber deutlich, dass es mindestens eine Pep25-responsive Sequenz aus Motivgruppe 27 gibt, in der WRKY70 wahrscheinlich nicht direkt an der Regulation beteiligt ist. 27D-10_M1S2 enthält eine Pep25-responsive Region, die mit der Kernsequenz aus Motivgruppe 27 und damit der WRKY70-TFBS überlappt. Trotz dieser Tatsache findet keine direkte Bindung von WRKY70 an diese Sequenz statt. Dies bedeutet, dass es sich bei der Pep25-responsiven Region in 27D-10_M1S2 um ein eigenständiges *cis*-Element handelt, welches anders reguliert wird als die Sequenz 30I-8_M1S1, welche die WRKY70-TFBS enthält. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass die bei Koschmann (2012) durchgeführte Gruppierung von Sequenzmotiven dazu führen kann, dass scheinbar sehr ähnliche Sequenzen der gleichen Motivgruppe zugeordnet werden, diese aber trotz ihrer Ähnlichkeit durch andere TF reguliert werden, bzw. verschiedene *cis*-Elemente enthalten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass aus den bei Koschmann *et al.* (Koschmann *et al.*, 2012) beschriebenen Pathogen-responsiven Sequenzen neue TFBS und damit möglicherweise auch neue Regulatoren der Pathogenantwort identifiziert werden können. Dies unterstreicht den Nutzen der bioinformatischen Analysen und die Effizienz des gewählten experimentellen Ansatzes. Neben weiterer Analysen der hier beschriebenen WRKY70-TFBS bzw. der WRKY70-Zielgene, könnten in Zukunft mittels ähnlicher Vorgehensweisen weitere, möglicherweise bisher unbekannte *cis*-Sequenzen bzw. TFBS charakterisiert werden. Dadurch sollte es möglich sein, weitere Regulatoren der Pathogenantwort zu identifizieren. Eine Optimierung des Systems scheint dabei besonders im Hinblick auf die verwendete TF-only cDNA-Bank sinnvoll zu sein. Die Wahrscheinlichkeit,

mittels Yeast One-Hybrid-Screening einen neuen TF zu identifizieren, steigt mit der Zahl der in der Bank vertretenen TF. Daher ist es erstrebenswert, diese in Zukunft zu erhöhen.

7. Zusammenfassung

Pflanzen sind einer Vielzahl von Phytopathogenen ausgesetzt und besitzen daher komplexe Resistenz- und Abwehrmechanismen. Ein wichtiger Bestandteil der Pathogenabwehr ist die massive transkriptionelle Reprogrammierung, z.B. zur Induktion von Abwehrgenen. Neben den an dieser Reprogrammierung beteiligten Transkriptionsfaktoren (TF), sind auch deren Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFBS) in den Promotoren der Zielgene dafür unverzichtbar. Bioinformatische Analysen haben in der Vergangenheit zur Identifikation neuer potentieller TFBS in Pathogen-responsiven Promotoren aus *A. thaliana* geführt. Viele dieser *cis*-Sequenzen können als synthetische Promotoren in Petersilie-Protoplasten eine Responsivität auf das MAMP (microbe-associated molecular pattern) Pep25 vermitteln. Zwei Sequenzen, die aus einer Gruppe Pep25-responsiver Sequenzen mit einer hoch konservierten [T/G]ACTTTT-Kernsequenz stammen, wurden in der vorliegenden Arbeit näher analysiert. Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob die konservierte Kernsequenz ein neues funktionelles *cis*-Element darstellt und ggf. die an der Regulation beteiligten TF zu identifizieren.

Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Kernsequenz in beiden Sequenzen unverzichtbar für die Pep25-Responsivität ist und diese daher Teil eines funktionellen *cis*-Elementes ist. In beiden Fällen, sind auch Nukleotide benachbart zur Kernsequenz für die Responsivität notwendig. Die Untersuchung von Promotor-Reportergenkonstrukten in transgenen *A. thaliana*-Linien belegt, dass beide bioinformatisch identifizierten Sequenzen eine Responsivität auf Infektion mit *Botrytis cinerea* vermitteln. Yeast One-Hybrid-Screenings und Transaktivierungsassays in Petersilie- und *Arabidopsis*-Protoplasten führten zur Identifizierung von WRKY70 als Aktivator der untersuchten Sequenzen.

WRKY70 ist ein zentraler Regulator der pflanzlichen Pathogenantwort. Die WRKY70-TFBS war bisher aber unbekannt. WRKY70 kann die beiden hier untersuchten *cis*-Sequenzen transaktivieren. Eine TFBS sowie die direkte *in vitro* Interaktion konnte aber nur mit einer der Sequenzen gezeigt werden. Die zweite Sequenz wird vermutlich indirekt durch WRKY70 reguliert. Die identifizierte TFBS hat die für WRKY-Faktoren untypische Sequenz CGACTTTT. Mutationen innerhalb der TFBS führen zum Verlust der Pep25-Responsivität, der Transaktivierbarkeit und der Bindung durch WRKY70. Bindungsstudien mit weiteren eng verwandten Pep25-responsiven Sequenzen legen nahe, dass die Konsensussequenz der WRKY70-TFBS als YGACTTTT beschrieben werden kann. Bioinformatische Analysen zeigen, dass diese Sequenz in WRKY70-induzierten Genen angereichert ist und dass potentielle WRKY70-Zielgene in die Pathogenantwort involviert sind.

In der vorliegenden Arbeit ist somit eine neue WRKY70-TFBS als Bestandteil eines Pathogen-responsiven *cis*-Elements, welches keine WRKY-TFBS enthält, identifiziert worden. Die Frage nach der *in vivo* Bedeutung dieser TFBS in der pflanzlichen Pathogenabwehr kann Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

8. Literaturverzeichnis

- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R.A., Mengiste, T.** (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *Plant J.* **48** (1): 28–44.
- Acosta, I.F., Farmer, E.E.** (2010). Jasmonates: The *Arabidopsis* Book. *The Arabidopsis Book* **8** (1): 1–13.
- Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., Innes, R.W.** (2007). Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (7): 2531–2536.
- Bailey, T.L., Elkan, C.** (1995). The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **3**: 21–29.
- Banerjee, S., Bose, I.** (2011). Transient pulse formation in jasmonate signaling pathway. *J. Theor. Biol.* **273** (1): 188–196.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* **20** (6): 1195–1197.
- Bent, A.F., Mackey, D.** (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 399–436.
- Besseau, S., Li, J., Palva, E.T.** (2012). WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **63** (7): 2667–2679.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J.I., Clough, S.J., Ort, D.R., Delucia, E.H.** (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* **33** (10): 1597–1613.
- Birkenbihl, R.P., Jach, G., Saedler, H., Huijser, P.** (2005). Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *J. Mol. Biol.* **352** (3): 585–596.
- Block, A., Alfano, J.R.** (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* **14** (1): 39–46.
- Boller, T., Felix, G.** (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60** (1): 379–406.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1-2): 248–254.
- Brand, L.H., Kirchler, T., Hummel, S., Chaban, C., Wanke, D.** (2010). DPI-ELISA: a fast and versatile method to specify the binding of plant transcription factors to DNA in vitro. *Plant Methods* **6**: 25.

- Brodersen, P., Petersen, M., Bjørn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.-A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., Mundy, J.** (2006). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via *EDS1* and *PAD4*. *Plant J.* **47** (4): 532–546.
- Browse, J.** (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60** (1): 183–205.
- Bülow, L., Brill, Y., Hehl, R.** (2010). AthaMap-assisted transcription factor target gene identification in *Arabidopsis thaliana*. *Database* 2010: baq034.
- Bülow, L., Schindler, M., Choi, C., Hehl, R.** (2004). PathoPlant®: A database on plant-pathogen interactions. *In Silico Biol.* **4** (4): 529–536.
- Bülow, L., Schindler, M., Hehl, R.** (2007). PathoPlant®: a platform for microarray expression data to analyze co-regulated genes involved in plant defense responses. *Nucleic Acids Res.* **35**: D841-5.
- Cai, M., Qiu, D., Yuan, T., Ding, X., Li, H., Duan, L.I., Xu, C., Li, X., Wang, S.** (2007). Identification of novel pathogen-responsive *cis*-elements and their binding proteins in the promoter of *OsWRKY13*, a gene regulating rice disease resistance. *Plant Cell Environ.* **31** (1): 86-96.
- Caplan, J., Padmanabhan, M., Dinesh-Kumar, S.P.** (2008). Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* **3** (3): 126–135.
- Cardon, G.H., Höhmann, S., Nettekheim, K., Saedler, H., Huijser, P.** (1997). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J.* **12** (2): 367–377.
- Cardon, G., Höhmann, S., Klein, J., Nettekheim, K., Saedler, H., Huijser, P.** (1999). Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* **237** (1): 91–104.
- Chan, C.-S., Guo, L., Shih, M.-C.** (2001). Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **46** (2): 131-141.
- Che, D., Jensen, S., Cai, L., Liu, J.S.** (2005). BEST: binding-site estimation suite of tools. *Bioinformatics* **21** (12): 2909–2911.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S., Solano, R.** (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11** (5): 486–494.
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R.P., Somssich, I.E.** (2008). Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol. Biol.* **68** (1-2): 81–92.
- Clough, S.J., Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16** (6): 735–743.
- Coll, N.S., Eppe, P., Dangl, J.L.** (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* **18** (8): 1247–1256.

- Contreras-Moreira, B.** (2010). 3D-footprint: a database for the structural analysis of protein-DNA complexes. *Nucleic Acids Res.***38** (suppl_1): D91-97.
- Contreras-Moreira, B., Branger, P.-A., Collado-Vides, J.** (2007). TFmodeller: comparative modelling of protein DNA complexes. *Bioinformatics* **23** (13): 1694–1696.
- Cormack, R.S., Eulgem, T., Rushton, P.J., Köchner, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E.** (2002). Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochim. Biophys. Acta* **1576** (1–2): 92–100.
- Coutu, C., Brandle, J., Brown, D., Brown, K., Miki, B., Simmonds, J., Hegedus, D.** (2007). pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res.* **16** (6): 771–781.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** (6839): 826–833.
- Dangl, J.L., Ritter, C., Gibbon, M.J., Mur, L.A., Wood, J.R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J.D., Vivian, A.** (1992). Functional homologs of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance gene in bean and pea. *Plant Cell* **4** (11): 1359–1369.
- Danhorn, T., Fuqua, C.** (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **61** (1): 401–422.
- Deblaere, R., Bytebier, B., Greve, H. de, Deboeck, F., Schell, J., van Montagu, M., Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.***13** (13): 4777.
- Durrant, W.E., Dong, X.** (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42** (1): 185–209.
- Ellis, J.G., Dodds, P.N., Lawrence, G.J.** (2007). Flax Rust Resistance Gene Specificity is Based on Direct Resistance-Avirulence Protein Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45** (1): 289–306.
- Eulgem, T.** (2005). Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* **10** (2): 71–78.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5** (5): 199–206.
- Eulgem, T., Somssich, I.E.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10** (4): 366–371.
- Flor, H.H.** (1947). Inheritance of reaction to rust in flax. *J. Agric. Res.* **74**: 241–262.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., Zhang, Y.** (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res.* **18** (12): 1190–1198.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A.** (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Mol. Plant Microbe In.* **19** (7): 711–724.

- Gietz, R.D., Schiestl, R.H.** (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2** (1): 31–34.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43** (1): 205–227.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Metraux, J.-P., Zhu, T., Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* **34** (2): 217–228.
- Guo, A.-Y., Zhu, Q.-H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., Luo, J.** (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* **418** (1–2): 1–8.
- Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3** (4): 315–319.
- Hertz, G.Z., Stormo, G.D.** (1999). Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* **15** (7–8): 563–577.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6** (13): 3901–3907.
- Jensen, S.T., Liu, J.S.** (2004). BioOptimizer: a Bayesian scoring function approach to motif discovery. *Bioinformatics* **20** (10): 1557–1564.
- Jiang, Y., Deyholos, M.K.** (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol. Biol.* **69** (1–2): 91–105.
- Johnson, C.S., Kolevski, B., Smyth, D.R.** (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* **14** (6): 1359–1375.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444** (7117): 323–329.
- Kankainen, M., Holm, L.** (2004). POBO, transcription factor binding site verification with bootstrapping. *Nucleic Acids Res.* **32** (Web Server): W222.
- Klein, J., Saedler, H., Huijser, P.** (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Mol. Gen. Genet.* **250** (1): 7–16.
- Knoth, C., Ringler, J., Dangl, J.L., Eulgem, T.** (2007). *Arabidopsis* WRKY70 is required for full *RPP4*-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol. Plant Microbe In.* **20** (2): 120–128.
- Kong, Q., Qu, N., Gao, M., Zhang, Z., Ding, X., Yang, F., Li, Y., Dong, O.X., Chen, S., Li, X., Zhang, Y.** (2012). The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24** (5): 2225–2236.

- Koschmann, J., Machens, F., Becker, M., Niemeyer, J., Schulze, J., Bülow, L., Stahl, D.J., Hehl, R.** (2012). Integration of Bioinformatics and Synthetic Promoters Leads to the Discovery of Novel Elicitor-Responsive *cis*-Regulatory Sequences in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **160** (1): 178–191.
- Lai, Z., Vinod, K., Zheng, Z., Fan, B., Chen, Z.** (2008). Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol.* **8**: 68.
- Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A.P., Memelink, J., Pieterse, C.M.J., Ritsema, T.** (2010). Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of *Arabidopsis* Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. *Mol. Plant Microbe In.* **23** (2): 187–197.
- Liang, X., Nazarenius, T.J., Stone, J.M.** (2008). Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance. *Biochemistry* **47** (12): 3645–3653.
- Li, J., Brader, G., Kariola, T., Palva, E.T.** (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.* **46** (3): 477–491.
- Li, J., Brader, G., Palva, E.** (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16** (2): 319–331.
- Li, J.-F., Li, L., Sheen, J.** (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods* **6** (1): 1.
- Liu, X., Brutlag, D.L., Liu, J.S.** (2001). BioProspector: discovering conserved DNA motifs in upstream regulatory regions of co-expressed genes. *Pac. Symp. Biocomput.*: 127–138.
- Luo, M., Dennis, E.S., Berger, F., Peacock, W.J., Chaudhury, A.** (2005). *MINISEED3* (*MINI3*), a WRKY family gene, and *HAIKU2* (*IKU2*), a leucine-rich repeat (LRR) Kinase gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** (48): 17531–17536.
- Maas, C., Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., Werr, W.** (1991). The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. *Plant Mol. Biol.* **16** (2): 199–207.
- Mahony, S., Benos, P.V.** (2007). STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res.* **35** (suppl 2): W253-W258.
- Mehrotra, R., Kiran, K., Chaturvedi, C.P., Ansari, S.A., Lodhi, N., Sawant, S., Tuli, R.** (2005). Effect of copy number and spacing of the ACGT and GT *cis* elements on transient expression of minimal promoter in plants. *J. Genet.* **84** (2): 183–187.
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R.** (2003). The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15** (11): 2551–2565.
- Mikkelsen, M.D., Thomashow, M.F.** (2009). A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **60** (2): 328–339.

- Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Ohme-Takagi, M.** (2010). Efficient Yeast One-/Two-Hybrid Screening Using a Library Composed Only of Transcription Factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51** (12): 2145–2151.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (49): 19613–19618.
- Moore, J.W., Loake, G.J., Spoel, S.H.** (2011). Transcription Dynamics in Plant Immunity. *Plant Cell* **23** (8): 2809–2820.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113** (7): 935–944.
- Mur, L.A.** (2005). The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiol.* **140** (1): 249–262.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* **34** (2): 137–148.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., Jones, J.D.G.** (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* **135** (2): 1113–1128.
- Nicaise, V., Roux, M., Zipfel, C.** (2009). Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. *Plant Physiol.* **150** (4): 1638–1647.
- Niemeyer, J., Machens, F., Fornefeld, E., Keller-Hüschemenger, J., Hehl, R.** (2011). Factors required for the high CO₂ specificity of the anaerobically induced maize *GapC4* promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* **34** (2): 220–229.
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests. *J. Agr. Sci.* **144** (01): 31–43.
- Pandey, S.P., Somssich, I.E.** (2009). The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiol.* **150** (4): 1648–1655.
- Paz-Ares, J.** (2002). REGIA, An EU Project on Functional Genomics of Transcription Factors from *Arabidopsis thaliana*. *Comp. Funct. Genomics* **3** (2): 102–108.
- Pieterse, C.M., van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., van Wees, S.C.** (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28** (1): 489–521.
- Qiu, J.-L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J., Petersen, M.** (2008). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.* **27** (16): 2214–2221.

- Rafiqi, M., Bernoux, M., Ellis, J.G., Dodds, P.N.** (2009). In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20** (9): 1017–1024.
- Ren, C.-M., Zhu, Q., Gao, B.-D., Ke, S.-Y., Yu, W.-C., Xie, D.-X., Peng, W.** (2008). Transcription factor WRKY70 displays important but no indispensable roles in jasmonate and salicylic acid signaling. *J. Integr. Plant Biol.* **50** (5): 630–637.
- Robatzek, S., Somssich, I.E.** (2001). A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* **28** (2): 123–133.
- Robert-Seilanianantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G.** (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 317–343.
- Roth, F.P., Hughes, J.D., Estep, P.W., Church, G.M.** (1998). Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat. Biotechnol.* **16** (10): 939–945.
- Rushton, P.J.** (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J.* **15**: 5690–5700.
- Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I.E.** (2002). Synthetic Plant Promoters Containing Defined Regulatory Elements Provide Novel Insights into Pathogen- and Wound-Induced Signaling. *Plant Cell* **14** (4): 749–762.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J.** (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* **15** (5): 247–258.
- Sambrook, J., Russwell, D.W.** (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Meth.* **9** (7): 671–675.
- Segonzac, C., Zipfel, C.** (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria: Host–microbe interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **14** (1): 54–61.
- Shim, J.S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y.-W., Choi, Y., Lee, J.S., Song, J.T., Kim, J.-K., Choi, Y.D.** (2013). AtMYB44 regulates *WRKY70* expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J.* **73** (3): 483–495.
- Shiu, S.-H.** (2004). Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Cell* **16** (5): 1220–1234.
- Sprenger-Haussels, M., Weisshaar, B.** (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* **22** (1): 1–8.
- Stone, J.M., Liang, X., Nekl, E.R., Stiers, J.J.** (2005). *Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J.* **41** (5): 744–754.

- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., Krysan, P.J.** (2006). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiol.* **143** (2): 661–669.
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Borén, M., Ahlandsberg, S., Jansson, C.** (2003). A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the *iso1* Promoter. *Plant Cell* **15** (9): 2076–2092.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X.** (2008). Plant Immunity Requires Conformational Charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* **321** (5891): 952–956.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* **141** (2): 373–378.
- Tsuda, K., Katagiri, F.** (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13** (4): 459–465.
- Tuerk, C., Gold, L.** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249** (4968): 505–510.
- Ülker, B., Shahid Mukhtar, M., Somssich, I.E.** (2007). The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta* **226** (1): 125–137.
- Ülker, B., Somssich, I.E.** (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7** (5): 491–498.
- Umrat, F.** (2012). Auswirkung transienter Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren auf potenzielle Zielsequenzen. Bachelor Arbeit (TU Braunschweig).
- van der Biezen, E.A., Jones, J.D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23** (12): 454–456.
- van der Hoorn, R.A.L., Kamoun, S.** (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20** (8): 2009–2017.
- van Verk, M.C., Neeleman, L., Bol, J.F., Linthorst, H.J.M.** (2011). Tobacco Transcription Factor NtWRKY12 Interacts with TGA2.2 in vitro and in vivo. *Front. Plant Sci.* **2**.
- van Verk, M.C., Pappaioannou, D., Neeleman, L., Bol, J.F., Linthorst, H.J.M.** (2008). A Novel WRKY Transcription Factor Is Required for Induction of *PR-1a* Gene Expression by Salicylic Acid and Bacterial Elicitors. *Plant Physiol.* **146** (4): 1983–1995.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (12): 7209–7214.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47** (1): 177–206.

- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X., Zhou, J.-M.** (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-Ribosyltransferase Inhibits *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. *Plant Cell* **22** (6): 2033–2044.
- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.-y., Stacey, M.G., Stacey, G.** (2008). A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20** (2): 471–481.
- Warren, R.F., Merritt, P.M., Holub, E., Innes, R.W.** (1999). Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* **152** (1): 401–412.
- Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Böttner, S., Oñate-Sánchez, L., Dröge-Laser, W.** (2011). High-throughput Protoplast Trans Activation (PTA) System for the analysis of *Arabidopsis* transcription factor function. *Plant J.* **68** (3): 60-569.
- Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G., Desveaux, D.** (2010). The type III effector HopF2 Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (5): 2349–2354.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* **2** (8): e718.
- Wu, F.-H., Shen, S.-C., Lee, L.-Y., Lee, S.-H., Chan, M.-T., Lin, C.-S.** (2009a). Tape-*Arabidopsis* Sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods* **5** (1): 16.
- Wu, S., Lu, D., Kabbage, M., Wei, H.-L., Swingle, B., Records, A.R., Dickman, M., He, P., Shan, L.** (2011). Bacterial Effector HopF2 Suppresses *Arabidopsis* Innate Immunity at the Plasma Membrane. *Mol. Plant Microbe In.* **24** (5): 585–593.
- Wu, X., Shiroto, Y., Kishitani, S., Ito, Y., Toriyama, K.** (2009b). Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep.* **28** (1): 21–30.
- Xing, D.-H., Lai, Z.-B., Zheng, Z.-Y., Vinod, K.M., Fan, B.-F., Chen, Z.-X.** (2008). Stress- and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Mol. Plant* **1** (3): 459–470.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., Shikanai, T.** (2009). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21** (1): 347–361.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Nunokawa, E., Ishizuka, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., Yokoyama, S.** (2004). A Novel Zinc-binding Motif Revealed by Solution Structures of DNA-binding Domains of *Arabidopsis* SBP-family Transcription Factors. *J. Mol. Biol.* **337** (1): 49–63.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Watanabe, S., Inoue, M., Yamasaki, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yokoyama, S.** (2012). Structural Basis for Sequence-specific DNA Recognition by an *Arabidopsis* WRKY Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* **287** (10): 7683–7691.

- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2** (7): 1565–1572.
- Zhang, H., Li, L.** (2013). *SQUAMOSA* Promoter Binding Protein-Like7 regulated micro408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **74** (1): 98-109.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., Zhou, J.-M.** (2007a). A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* **1** (3): 175–185.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., Dong, X.** (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (11): 6523–6528.
- Zhang, Y., Schwarz, S., Saedler, H., Huijser, P.** (2007b). SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **63** (3): 429–439.
- Zhang, Y., Wang, L.** (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol. Biol* **5**: 1.
- Zhou, X., Jiang, Y., Yu, D.** (2011). WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Mol. Cells* **31** (4): 303–313.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., Felix, G.** (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125** (4): 749–760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428** (6984): 764–767.
- Zou, C., Sun, K., Mackaluso, J.D., Seddon, A.E., Jin, R., Thomashow, M.F., Shiu, S.-H.** (2011). Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108** (36): 14992–14997.

9. Anhang

Anhang 1:	Aminosäuresequenz des klonierten SPL7-Proteins	155
Anhang 2:	Pep25-Responsivität aller 30I-8_M1S1-Mutationen	156
Anhang 3:	Pep25-Responsivität aller 27D-10_M1S2-Mutationen.....	158
Anhang 4:	Ergebnisse von <i>Agrobacterium</i> -Infiltrationsexperimenten an <i>N. benthamiana</i>	161
Anhang 5:	Tabelle der transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien	162
Anhang 6:	GUS-Färbungen von 35S-pGPTV_bar- und TATA-pGPTV_bar-Keimlingen.....	164
Anhang 7:	GUS-Färbungen von transgenen 4xD-pGPTV_bar-Linien	165
Anhang 8:	GUS-Färbungen von 30I-8_M1S1-pGPTV_bar-Keimlingen	167
Anhang 9:	GUS-Färbungen von adulten 30I-8_M1S1-pGPTV_bar-Linien	169
Anhang 10:	GUS-Färbungen von 27D-10_M1S2-pGPTV_bar-Keimlingen	171
Anhang 11:	GUS-Färbungen von adulten 27D-10_M1S2-pGPTV_bar-Linien	173
Anhang 12:	Qualitative und quantitative GUS-Assays mit <i>Botrytis cinerea</i> infizierten Blättern transgener 30I-8_M1S1-Linien	175
Anhang 13:	Qualitative und quantitative GUS-Assays mit <i>Pto</i> DC3000 infizierten Blättern transgener 30I-8_M1S1-Linien	178
Anhang 14:	Qualitative und quantitative GUS-Assays mit <i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> infizierten Blättern transgener 30I-8_M1S1-Linien	182
Anhang 15:	Qualitative und quantitative GUS-Assays mit <i>B. cinerea</i> infizierten Blättern transgener 27D-10_M1S2-Linien.....	186
Anhang 16:	Qualitative und quantitative GUS-Assays mit <i>Pto</i> DC3000 infizierten Blättern transgener 27D-10_M1S2-Linien.....	189
Anhang 17:	Qualitative und quantitative GUS-Assays mit <i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> infizierten Blättern transgener 27D-10_M1S2-Linien.....	192
Anhang 18:	Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit WRKY70 und verschiedenen Reportergenkonstrukten in Petersilie-Protoplasten	195
Anhang 19:	Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit WRKY70 und verschiedenen Reportergenkonstrukten in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	206
Anhang 20:	Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit SPL7 und verschiedenen Reportergenkonstrukten in Petersilie-Protoplasten	209
Anhang 21:	Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit SPL7 und verschiedenen Reportergenkonstrukten in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	211

Anhang 22:	Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit JAG und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in <i>Petersilie</i> -Protoplasten	212
Anhang 23:	Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit JAG und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	213
Anhang 24:	Analyse und Konzentrationsbestimmung der verwendeten SPL7-DBD-Isolate	215
Anhang 25:	Analyse und Konzentrationsbestimmung der verwendeten WRKY70-Isolate	215
Anhang 26:	Liste WRKY70-reprimierter und –induzierter Gene	216
Anhang 27:	Unabhängig reproduzierte Gelshift-Experimente mit WRKY70 und 30I-8_M1S1	217
Anhang 28:	POBO-Analysen mit modifizierten Konsensussequenzen der WRKY70-TFBS	218
Anhang 29:	Alignment aller Klasse III WRKY-Domänen aus <i>A. thaliana</i>	220
Anhang 30:	WRKY70 weist kaum Unterschiede zur Konsensussequenz der Klasse III WRKY-Domänen auf	220

Anhang 1: Aminosäuresequenz des klonierten SPL7-Proteins

Die bei NCBI angegebene SPL7-Aminosäuresequenz (SPL7) ist im Vergleich zur Sequenz des klonierten SPL7 (SPL7*) gezeigt. Identische Positionen sind durch Punkte markiert. Es kommt an den Positionen 89 und 242 zu Abweichungen.

		20		40	
SPL7	MSSLSQSPPP	PEMDIQPPAL	VNDDPSTYSS	ALWDWGDLLD	FAADERLLVD 50
SPL7* 50
	60	80	100		
SPL7	QIHFPVLSP	PLPPLIPTQT	PAESELDPSP	EESGSGSDRV	RKRDPRLICS 100
SPL7*Q. 100
	120	140			
SPL7	NFIEGMLPCS	CELDQKLED	AELPKKKRVR	GGSGVARCQV	PDCEADISEL 150
SPL7* 150
	160	180	200		
SPL7	KGYHKRHRVC	LRCATASFVV	LDGENKRYCQ	QCGKFHLLPD	FDEGKRSCRR 200
SPL7* 200
	220	240			
SPL7	KLERHNNRRK	RKPVDKGGVA	AEQQQVLSQN	DNSVIDVEDG	KDITC SSDQ 249
SPL7*A 250
	260	280	300		
SPL7	RAEEEPSLIF	EDRHITTQGS	VPFTRSINAD	NFVSVTGSGE	AQPDEGMNDT 299
SPL7* 300
	320	340			
SPL7	KFERSPSNGD	NKSAYSTVCP	TGRISFKLYD	WNPAEFPRRL	RHQIFQWLAN 349
SPL7* 350
	360	380	400		
SPL7	MPVELEGYIR	PGCTILTVFI	AMPEIMWAKL	SKDPVAYLDE	FILKPGKMLF 399
SPL7* 400
	420	440			
SPL7	GRGSMTVYLN	NMIFRLIKGG	TTLKRVDVKL	ESPKLQFVYP	TCFEAGKPIE 449
SPL7* 450
	460	480	500		
SPL7	LVVCGQNLLQ	PKCRFLVSFS	GKYLPHNYSV	VPAPDQDGKR	SCNNKFYKIN 499
SPL7* 500
	520	540			
SPL7	IVNSDPSLFG	PAFVEVENES	GLSNFIPLII	GDAAVCSEMK	LIEQKFNATL 549
SPL7* 550
	560	580	600		
SPL7	FPEGQEV TAC	SSLTCCCRDF	GERQSTFSGL	LLDIAWSVKV	PSAERTEQPV 599
SPL7* 600
	620	640			
SPL7	NRCQIKRYNR	VLNYLIQNNS	ASILGNVLHN	LETLVKKMEP	DSL VHCTCDC 649
SPL7* 650
	660	680	700		
SPL7	DVRLLENMD	LASDIHRKHQ	SPIESKVNPP	SSGCCC VSSQ	KDIPSRILNF 699
SPL7* 700
	720	740			
SPL7	NKDPEAGLDC	KERI QADCSP	DSGGKETDPL	LNKEVVMNVN	DIGDWPRKSC 749
SPL7* 750
	760	780	800		
SPL7	IKTHSALA FR	SRQTMFLIAT	FAVCFAVCAV	LYHPNKVTQL	AVAIRMRLVH 799
SPL7* 800
SPL7	KI	801			
SPL7*	..	802			

Anhang 2: Pep25-Responsivität aller 30I-8_M1S1-Mutationen

Gezeigt sind die normierten GUS-Werte [$\text{pmol 4-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$] aus verschiedenen Experimenten (Exp.) mit und ohne Pep25-Applikation (-/+ Pep25) sowie die Mittelwerte (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) zu jedem Konstrukt.

Konstrukt	Exp.	-Pep25	Mittelw.	Std.abw.	+Pep25	Mittelw.	Std.abw.
30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC	1	561	1.737	1.332	3.762	7.076	5.846
		788			3.929		
	2	1.048			6.692		
		850			4.645		
	3	718			4.622		
		798			4.931		
	4	1.971			4.787		
		1.526			3.540		
	5	5.608			25.342		
		5.026			20.763		
	6	1.942			6.425		
		1.602			4.946		
	7	1.361			3.856		
		1.442			5.861		
30I-8_M1S1-mut1-pBT10GUS/LUC	1	593	779	109	1.191	1.365	180
		725			1.132		
	2	845			1.645		
		748			1.277		
	3	818			1.443		
		943			1.500		
30I-8_M1S1-mut2-pBT10GUS/LUC	1	341	476	87	707	729	193
		535			676		
	2	425			528		
		578			1.141		
	3	416			669		
		562			653		
30I-8_M1S1-mut3-pBT10GUS/LUC	1	460	569	109	1.141	1.079	269
		428			641		
	2	676			1.292		
		614			1.237		
	3	513			791		
		720			1.370		
30I-8_M1S1-mut4-pBT10GUS/LUC	1	443	575	125	2.543	3.151	1.213
		454			2.518		
	2	690			3.282		
		468			2.012		
	3	754			5.726		
		641			2.824		

Anhang

Konstrukt	Exp.	-Pep25	Mittelw.	Std. abw.	+Pep25	Mittelw.	Std. abw.
30l-8_M1S1-mut5-pBT10GUS/LUC	1	188	236	66	372	338	108
		182			266		
	2	209			197		
		194			258		
	3	277			427		
		365			509		
30l-8_M1S1-mut6-pBT10GUS/LUC	1	3.303	2.654	1.660	9.742	8.704	5.359
		5.077			17.054		
	2	1.190			4.025		
		1.047			3.994		
30l-8_M1S1-mut7-pBT10GUS/LUC	1	1.191	1.075	147	1.741	1.374	348
		1.238			1.697		
	2	999			967		
		874			1.092		
30l-8_M1S1-mut8-pBT10GUS/LUC	1	1.650	1.318	597	3.081	2.499	1.064
		2.129			3.921		
	2	767			1.771		
		725			1.221		
30l-8_M1S1-mut9-pBT10GUS/LUC	1	897	704	225	911	887	62
		959			966		
	2	499			873		
		462			796		
30l-8_M1S1-mut10-pBT10GUS/LUC	1	1.178	811	268	1.503	1.371	97
		955			1.311		
	2	579			1.419		
		532			1.252		
30l-8_M1S1-mut11-pBT10GUS/LUC	1	810	837	89	2.974	2.594	347
		873			2.418		
	2	955			2.868		
		710			2.114		
30l-8_M1S1-mut12-pBT10GUS/LUC	1	584	435	87	744	598	116
		395			602		
	2	393			626		
		368			421		
30l-8_M1S1-mut13-pBT10GUS/LUC	1	500	499	46	857	975	77
		571			976		
	2	477			1.070		
		446			998		
30l-8_M1S1-mut14-pBT10GUS/LUC	1	665	752	92	1.683	2.865	980
		848			2.396		
	2	840			4.347		
		656			3.035		

Anhang 3: Pep25-Responsivität aller 27D-10_M1S2-Mutationen

Gezeigt sind die normierten GUS-Werte [$\text{pmol 4-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$] aus verschiedenen Experimenten (Exp.) mit und ohne Pep25-Applikation (-/+ Pep25) sowie die Mittelwerte (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) zu jedem Konstrukt.

Konstrukt	Exp.	-Pep25	Mittelw.	Std. abw.	+Pep25	Mittelw.	Std. abw.
27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC	1	2.200	2.593	873	40.246	51.256	20.011
		2.352			56.812		
	2	2.231			48.810		
		2.496			44.961		
	3	2.571			34.817		
		3.521			39.125		
	4	4.677			75.498		
		4.905			116.760		
	5	1.467			32.639		
		2.377			43.121		
	6	1.877			22.759		
		2.503			51.415		
	7	2.268			61.985		
		2.022			44.146		
	8	2.026			64.765		
		2.547			56.740		
27D-10_M1S2-mut1-pBT10GUS/LUC	1	1.129	1.480	248	18.062	18.699	3.081
		1.436			21.499		
	2	1.942			22.699		
		1.353			17.885		
	3	1.432			13.046		
		1.589			19.000		
27D-10_M1S2-mut2-pBT10GUS/LUC	1	483	380	69	584	505	72
		451			560		
	2	319			447		
		402			586		
	3	315			440		
		311			417		
27D-10_M1S2-mut3-pBT10GUS/LUC	1	713	926	320	1.049	1.299	495
		726			1.027		
	2	606			634		
		808			1.171		
	3	1.193			2.029		
		1.509			1.886		

Anhang

Konstrukt	Exp.	-Pep25	Mittelw.	Std. abw.	+Pep25	Mittelw.	Std. abw.
27D-10_M1S2-mut4-pBT10GUS/LUC	1	826	1.206	661	12.500	12.104	3.650
		721			8.391		
	2	803			13.715		
		871			9.203		
	3	1.425			9.696		
		2.592			19.118		
27D-10_M1S2-mut5-pBT10GUS/LUC	1	490	815	329	440	1.029	414
		524			930		
	2	679			1.015		
		667			686		
	3	1.344			1.623		
		1.186			1.476		
27D-10_M1S2-mut6-pBT10GUS/LUC	1	270	413	253	427	645	141
		370			654		
	2	221			545		
		963			854		
	3	271			614		
		386			776		
27D-10_M1S2-mut7-pBT10GUS/LUC	1	593	464	99	345	382	71
		573			520		
	2	510			422		
		374			307		
	3	356			349		
		376			349		
27D-10_M1S2-mut8-pBT10GUS/LUC	1	744	571	135	1.096	966	220
		758			1.316		
	2	509			887		
		490			617		
	3	535			1.047		
		389			836		
27D-10_M1S2-mut9-pBT10GUS/LUC	1	672	502	97	1.096	954	164
		573			1.196		
	2	441			768		
		371			861		
	3	486			1.028		
		468			773		

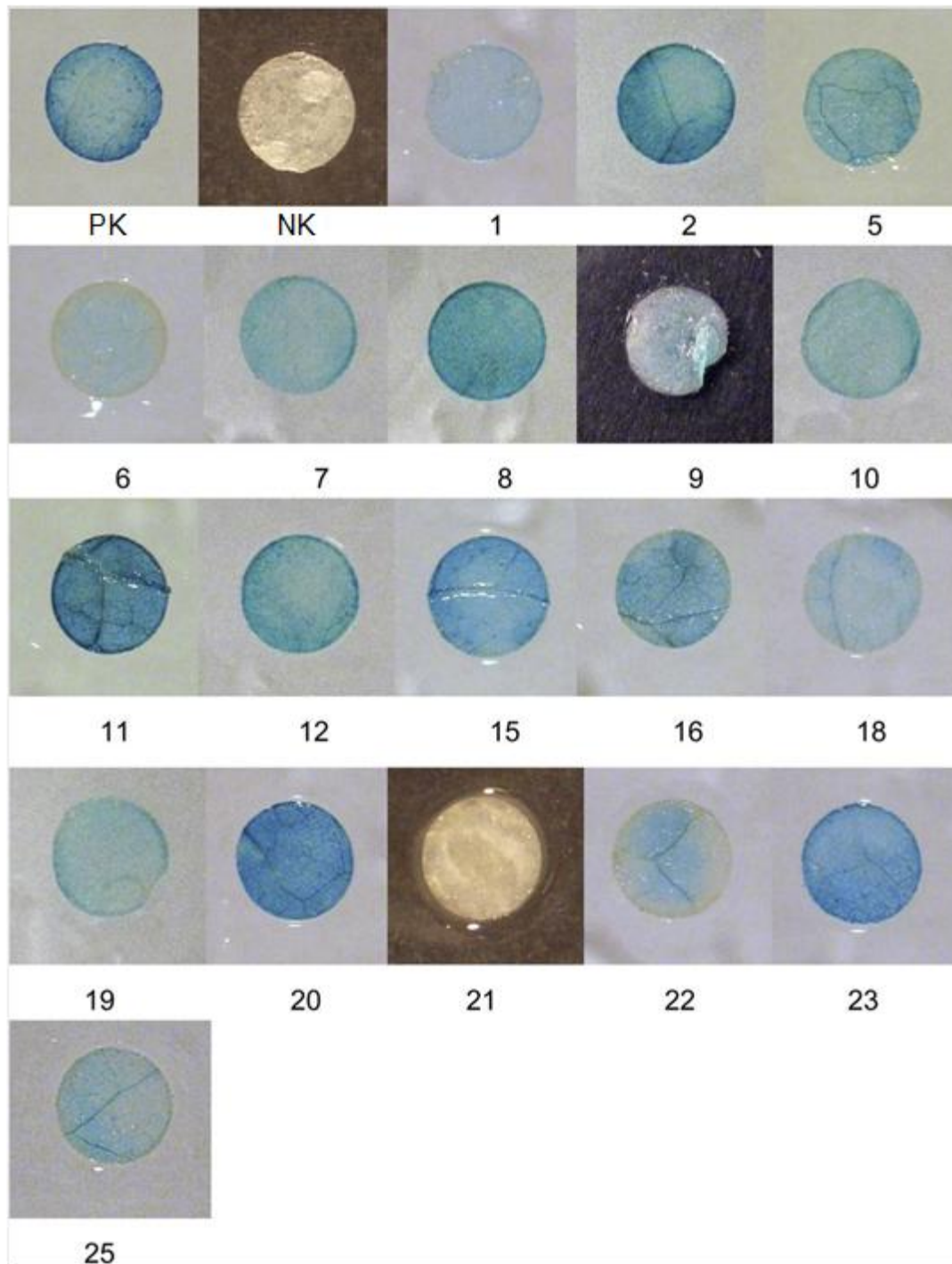
Anhang

Konstrukt	Exp.	-Pep25	Mittelw.	Std. abw.	+Pep25	Mittelw.	Std. abw.
27D-10_M1S2- mut10- pBT10GUS/LUC	1	1.250	917	225	2.396	1.812	343
		1.165			1.877		
	2	659			1.611		
		678			1.345		
	3	826			1.595		
		927			2.046		

Anhang 4: Ergebnisse von *Agrobacterium*-Infiltrationsexperimenten an *N. benthamiana*

Wie bei Koschmann *et al.* (2012) beschrieben, wurden verschiedene *cis*-Sequenzen in Promotor-GUS-Konstrukten auf ihre Funktionalität in transienten Infiltrationsexperimenten an *N. benthamiana* untersucht. Gezeigt sind qualitative GUS-Färbungen von infiltriertem Blattmaterial. PK: Positiv-Kontrolle NK: Negativ-Kontrolle. Die Bezeichnung der Sequenzen entspricht der bei Koschmann *et al.* 30I-8_M1S1 entspricht Konstrukt 20, 27D-10_M1S2 entspricht Konstrukt 23.

Abbildung modifiziert nach Koschmann *et al.* (2012)



Anhang 5: Tabelle der transgenen *Arabidopsis thaliana*-Linien

Angegeben ist die Anzahl der Phosphinotricin-resistenten bzw. sensitiven Pflanzen in der T₁-Generation und deren mathematisches Verhältnis.

Für Pflanzen mit einem T-DNA-Locus wird nach Selbstung eine Segregation von 3:1 (resistent:sensitiv) erwartet.

Pflanzen mit zwei T-DNA-Loci segregieren im Verhältnis 15:1 (resistent:sensitiv)

Die aus der Segregation abgeleitete Zahl der T-DNA-Loci wurde mittel Chi²-Test nach folgender Formel überprüft (Freiheitsgrade = 1, p=0,95):

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^m \frac{(N_j - n_{0j})^2}{n_{0j}}$$

Mit N_j = beobachtet Anzahl (z.B. resistenter Pflanzen)
 n_{0j} = erwartete Anzahl (z.B. resistenter Pflanzen)
 m = verschiedene Kategorien (hier: 1 und 2, resistente bzw. sensitive Pflanzen)
 j = Anzahl Freiheitsgrade (hier: 1)

Ist Chi² größer als 3,84 so wurde die Hypothese auf einem Signifikanzniveau von 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit = 5%) abgelehnt. Ist Chi² kleiner 3,84 so wurde die Hypothese akzeptiert. Bei mit * gekennzeichneten Ergebnissen konnte mit dem Chi²-Test keine akzeptable Hypothese gefunden werden.

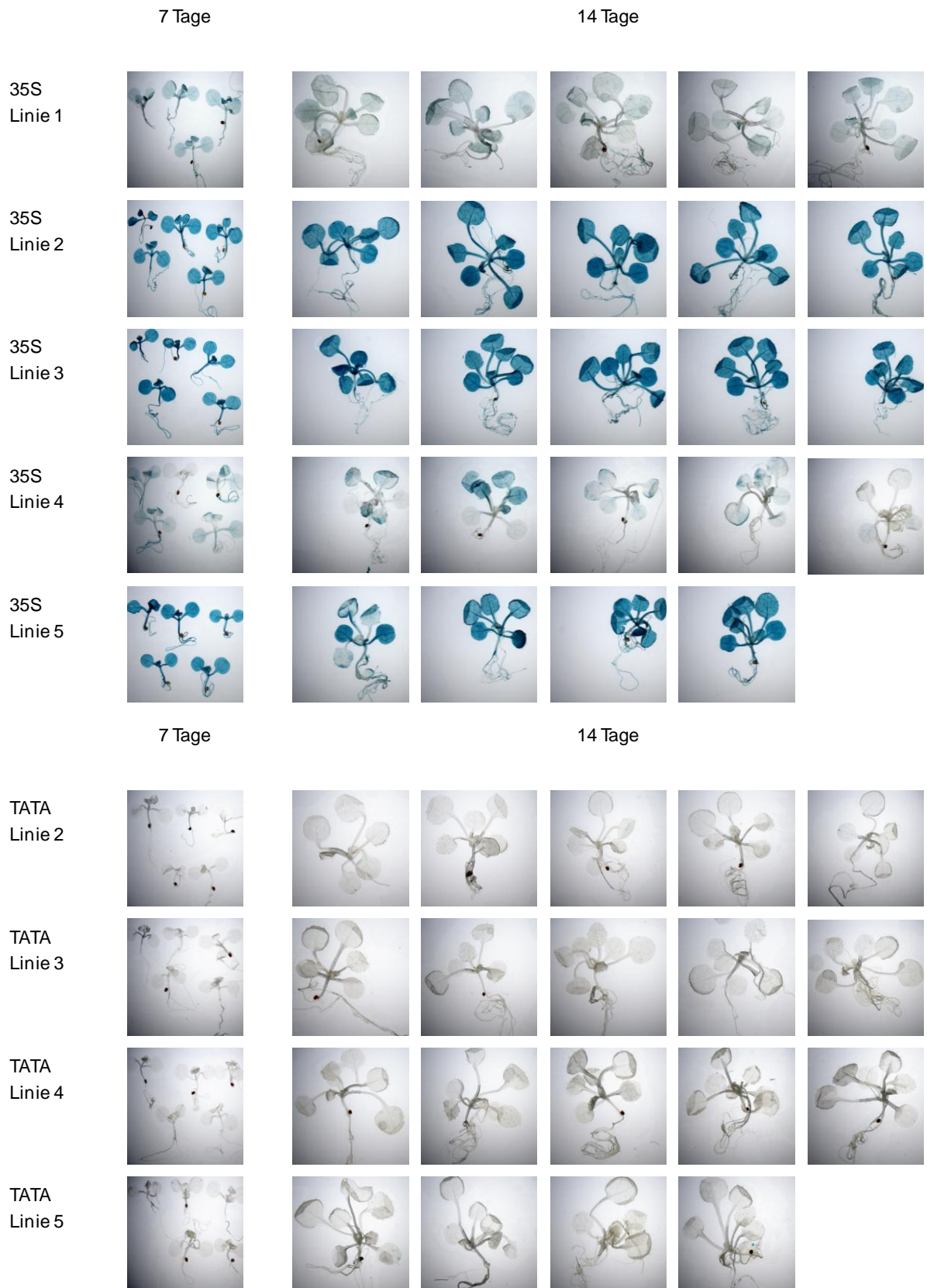
Konstrukt	Linie	Anzahl resistente	Anzahl sensitive	Verhältnis (resistent/sensitiv)	T-DNA-Loci
4xD-pGPTV_bar	1	146	22	6,6:1	*
4xD-pGPTV_bar	2	169	38	4,4:1	*
4xD-pGPTV_bar	3	69	7	9,8:1	*
4xD-pGPTV_bar	4	165	56	2,9:1	1
TATA-pGPTV_bar	2	122	11	11,1:1	2
TATA-pGPTV_bar	3	57	26	2,2:1	1
TATA-pGPTV_bar	4	108	13	8,3:1	*
TATA-pGPTV_bar	5	64	7	9,1:1	2
35S-pGPTV_bar	1	124	51	2,4:1	1
35S-pGPTV_bar	2	109	39	2,8:1	1
35S-pGPTV_bar	3	133	56	2,4:1	1
35S-pGPTV_bar	4	174	12	14,5:1	2
35S-pGPTV_bar	5	33	17	1,9:1	1

Anhang

Konstrukt	Linie	Anzahl resistente	Anzahl sensitive	Verhältnis (resistent/sensitiv)	T-DNA-Loci
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	1	72	37	1,9:1	*
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	2	70	13	5,4:1	*
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	3	69	29	2,4:1	1
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	4	88	9	9,8:1	2
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	5	97	7	13:1	2
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	6	69	31	2,2:1	1
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	7	93	7	13,3:1	2
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	8	72	24	3:1	1
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	9	91	2	45,5:1	2
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	10	65	37	1,8:1	*
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	11	59	41	1,4:1	*
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	12	61	13	4,7:1	1
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	13	76	25	3:1	1
30I-8_M1S1-pGPTV_bar	14	71	28	2,5:1	1
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	1	68	33	2,1:1	1
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	2	66	47	1,4:1	*
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	3	110	14	7,9:1	*
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	4	115	36	3,2:1	1
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	5	145	9	16,1:1	2
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	7	151	47	3,2:1	1
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	8	189	22	8,6	*
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	9	163	42	3,9:1	1
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	10	145	13	11,2:1	2
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	11	197	21	9,4:1	*
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	12	55	25	2,2:1	1
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	13	106	16	6,6:1	*
27D-10_M1S2-pGPTV_bar	14	45	40	1,1:1	*

Anhang 6: GUS-Färbungen von 35S-pGPTV_bar- und TATA-pGPTV_bar-Keimlingen

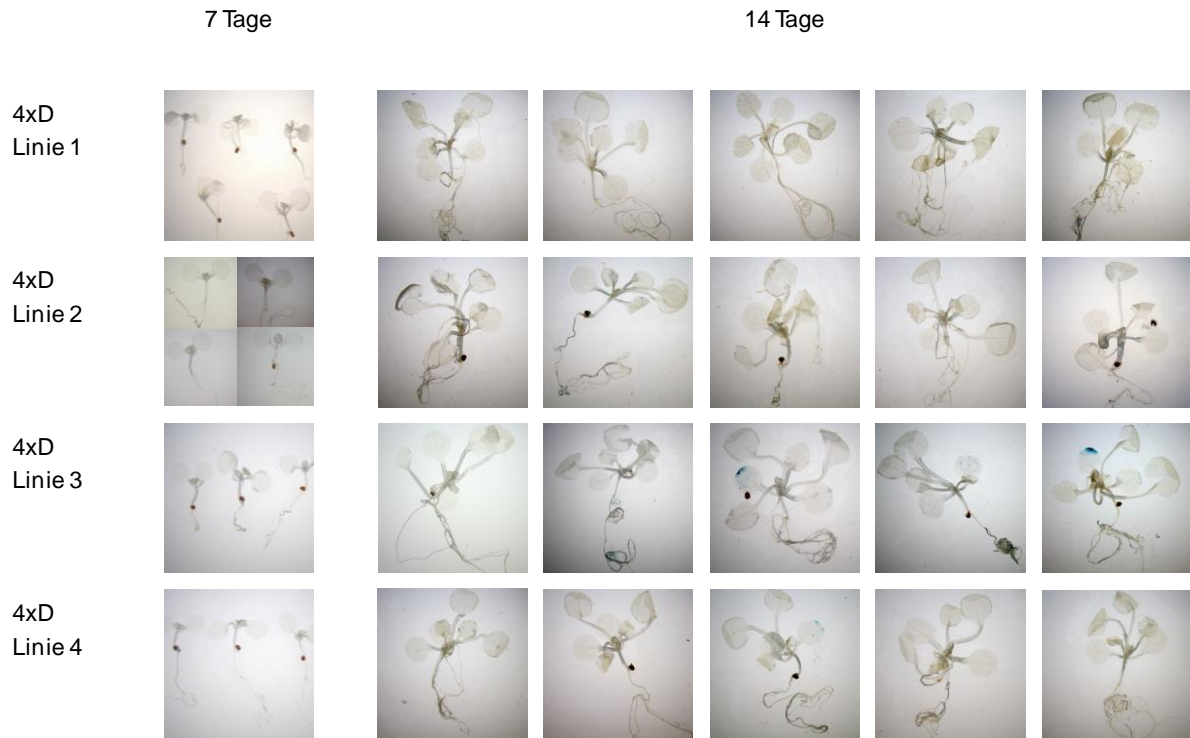
Qualitative GUS-Färbungen von 7 und 14 Tage alten Keimlingen transgener *Arabidopsis*-Linien. Aus einer Linie wurden stets mehrere Individuen untersucht. 35S: 35S-pGPTV_bar, TATA: TATA-pGPTV_bar



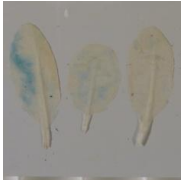




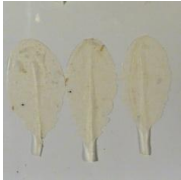






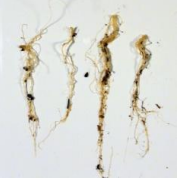


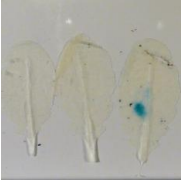
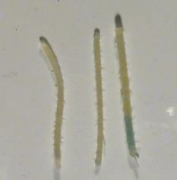
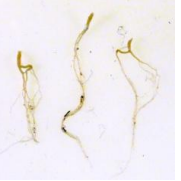

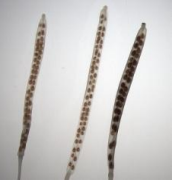
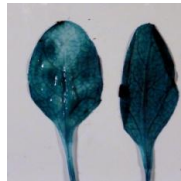
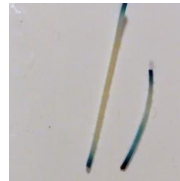
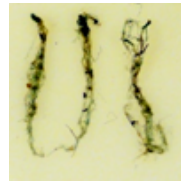


Anhang 7: GUS-Färbungen von transgenen 4xD-pGPTV_bar-Linien

Qualitative GUS-Färbungen transgener *Arabidopsis*-Linien. Aus einer Linie wurden stets mehrere Individuen untersucht. 4xD: 4xD-pGPTV_bar. Es wurden Färbungen an Keimlingen und verschiedenen Organen adulter Pflanzen durchgeführt.

Keimlinge



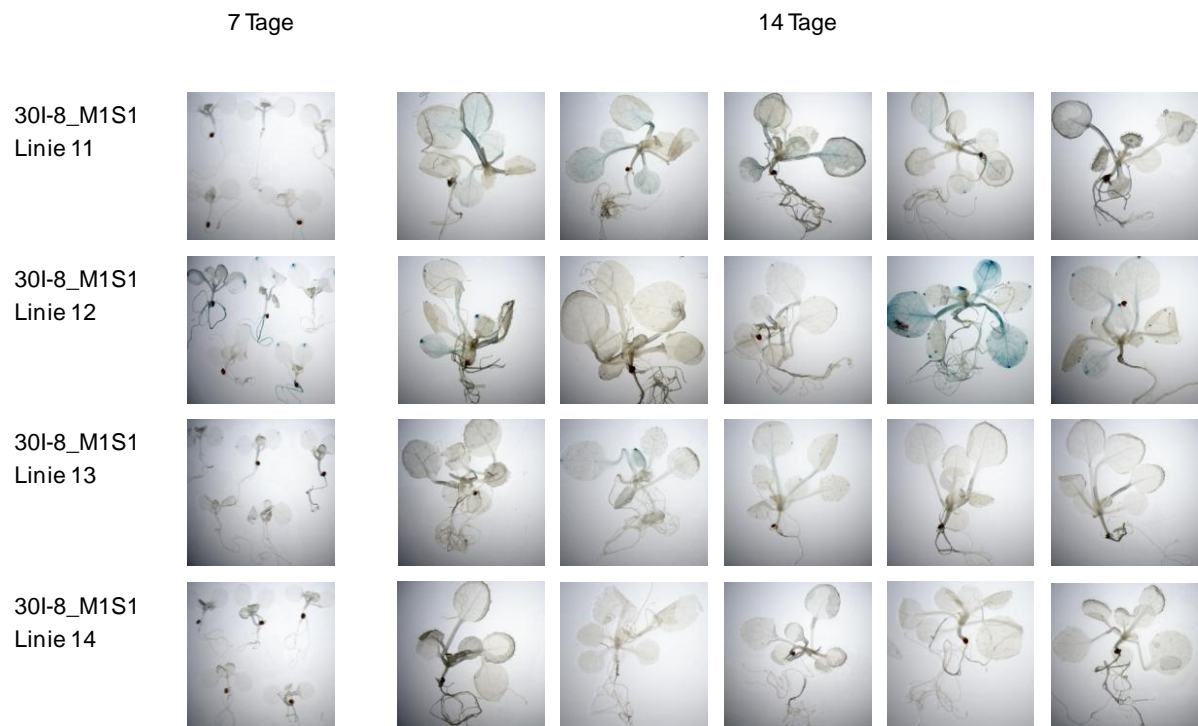
Adulte Pflanzen

	Blatt	Stängel	Wurzel	Blüte	Samen- schote
4xD Linie 1					
4xD Linie 2					
4xD Linie 3					
4xD Linie 4					
35S-GUS* *Repräsentative Beispiele					

Anhang 8: GUS-Färbungen von 30I-8_M1S1-pGPTV_bar-Keimlingen

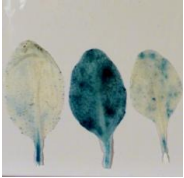
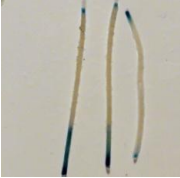



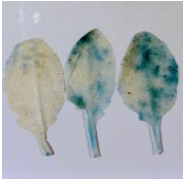
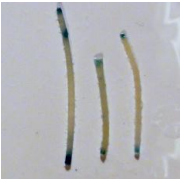



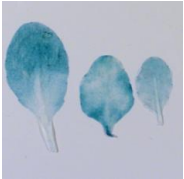
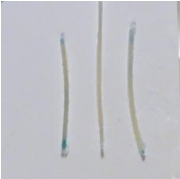


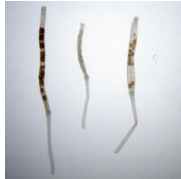
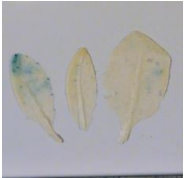
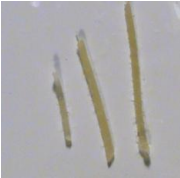
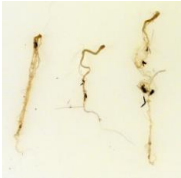

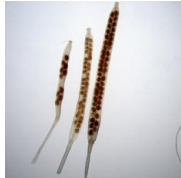
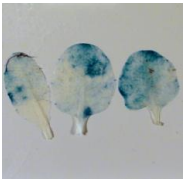

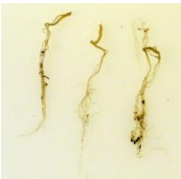


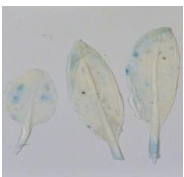
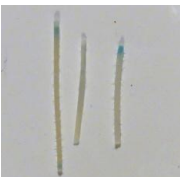



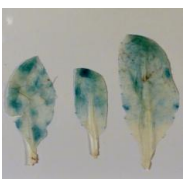




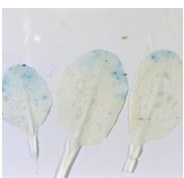
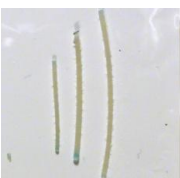



Qualitative GUS-Färbungen von 7 und 14 Tage alten Keimlingen transgener *Arabidopsis*-Linien. Aus einer Linie wurden stets mehrere Individuen untersucht.

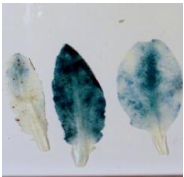

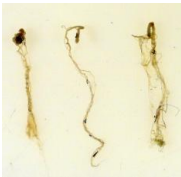
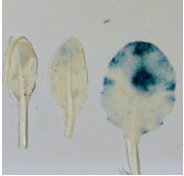




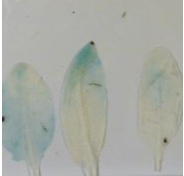




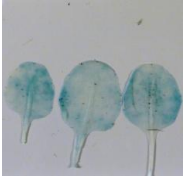




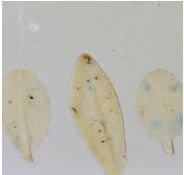




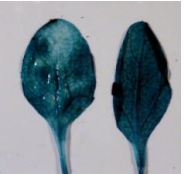
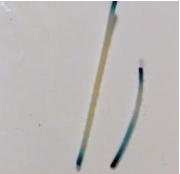
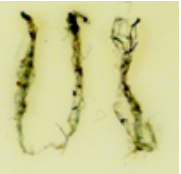






Anhang 9: GUS-Färbungen von adulten 30I-8_M1S1-pGPTV_bar-Linien

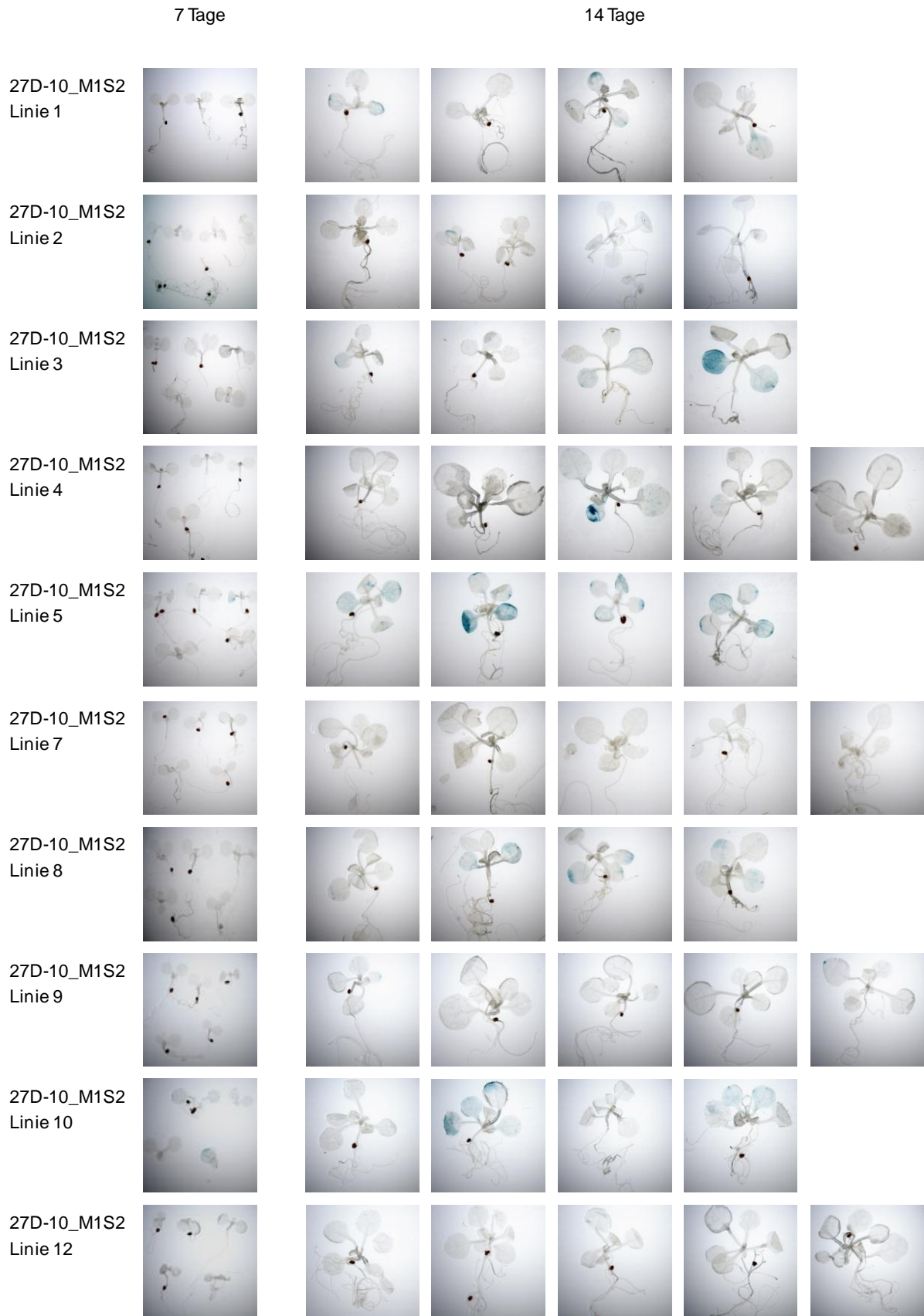
Qualitative GUS-Färbungen von verschiedenen Organen adulter, transgener *Arabidopsis*-Linien. Aus einer Linie wurden stets mehrere Individuen untersucht.

	Blatt	Stängel	Wurzel	Blüte	Samen- schote
30I-8_M1S1 Linie 1					
30I-8_M1S1 Linie 2					
30I-8_M1S1 Linie 3					
30I-8_M1S1 Linie 4					
30I-8_M1S1 Linie 5					
30I-8_M1S1 Linie 6					
30I-8_M1S1 Linie 7					
30I-8_M1S1 Linie 8					

	Blatt	Stängel	Wurzel	Blüte	Samen- schote
30I-8_M1S1 Linie 9					
30I-8_M1S1 Linie 10					
30I-8_M1S1 Linie 11					
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					
35S-GUS* *Repräsentative Beispiele					

Anhang 10: GUS-Färbungen von 27D-10_M1S2-pGPTV_bar-Keimlingen

Qualitative GUS-Färbungen von 7 und 14 Tage alten Keimlingen transgener *Arabidopsis*-Linien. Aus einer Linie wurden stets mehrere Individuen untersucht.



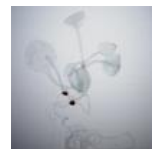
7 Tage

14 Tage

27D-10_M1S2
Linie 13





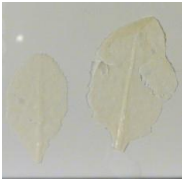



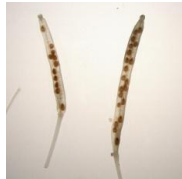
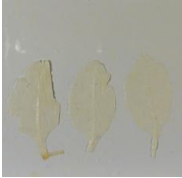
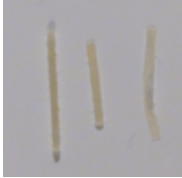



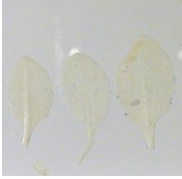

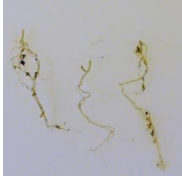







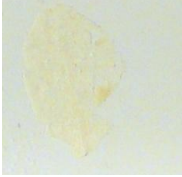




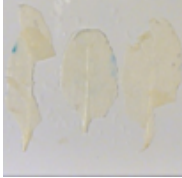


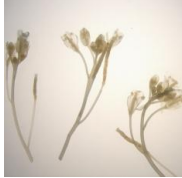



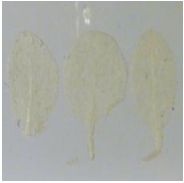



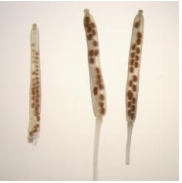


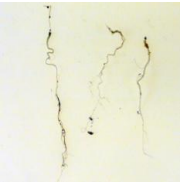

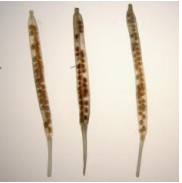
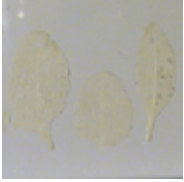

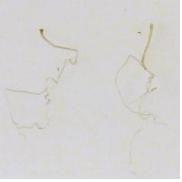


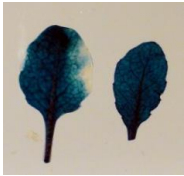
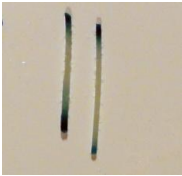


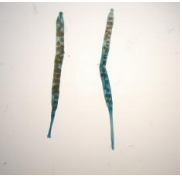
27D-10_M1S2
Linie 14



Anhang 11: GUS-Färbungen von adulten 27D-10_M1S2-pGPTV_bar-Linien

Qualitative GUS-Färbungen von verschiedenen Organen adulter, transgener *Arabidopsis*-Linien. Aus einer Linie wurden stets mehrere Individuen untersucht.

	Blatt	Stängel	Wurzel	Blüte	Samen- schote
27D-10_M1S2 Linie 1					
27D-10_M1S2 Linie 2					
27D-10_M1S2 Linie 3					
27D-10_M1S2 Linie 4					
27D-10_M1S2 Linie 5					
27D-10_M1S2 Linie 7					
27D-10_M1S2 Linie 8					




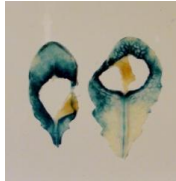

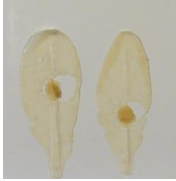


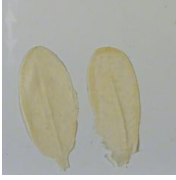
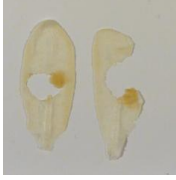
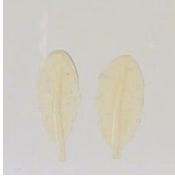
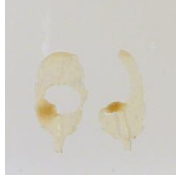

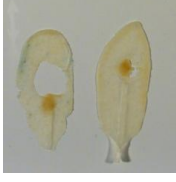


	Blatt	Stängel	Wurzel	Blüte	Samen- schote
27D-10_M1S2 Linie 9					
27D-10_M1S2 Linie 10					
27D-10_M1S2 Linie 12					
35S-GUS* *Repräsentative Beispiele					

Anhang 12: Qualitative und quantitative GUS-Assays mit *Botrytis cinerea* infizierten Blättern transgener 30I-8_M1S1-Linien




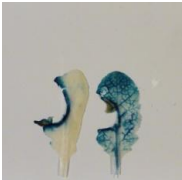



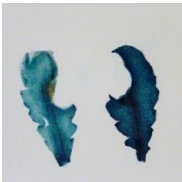

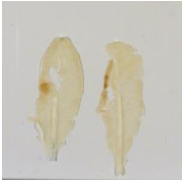
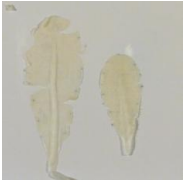
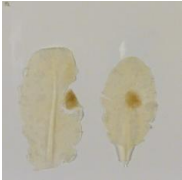
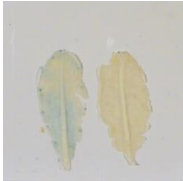


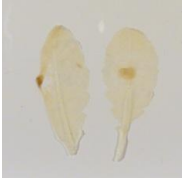
Die Färbungen bzw. Messungen wurden drei Tage nach Infektion durchgeführt. Als Kontrollen dienen 4xD-GUS, 35S-GUS und TATA-GUS-Linien. Es wurden jeweils zwei Individuen einer Linie infiziert. Kontrolle: nicht infiziertes Blatt. *B. cinerea*: infiziertes Blatt

GUS-Färbungen:

Experiment 1

	Kontrolle	<i>B. cinerea</i>		Kontrolle	<i>B. cinerea</i>
30I-8_M1S1 Linie 3			4xD		
30I-8_M1S1 Linie 6			35S		
30I-8_M1S1 Linie 8			TATA		
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					

Experiment 2

	Kontrolle	<i>B. cinerea</i>		Kontrolle	<i>B. cinerea</i>
30I-8_M1S1 Linie 3			4xD		
30I-8_M1S1 Linie 6			35S		
30I-8_M1S1 Linie 8			TATA		
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					

Quantitative GUS-Messungen:

Exp. : Experiment; Ind.: Individuum, Mittelw.: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung, Ind.faktor: Induktionsfaktor (Mittelwert Infiziert/Mittelwert Kontrolle)


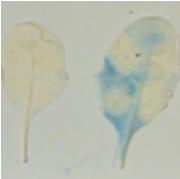
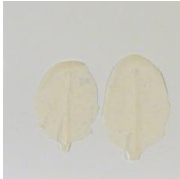
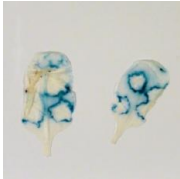


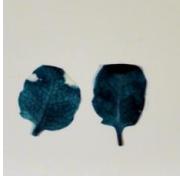
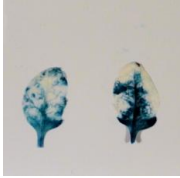








Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	<i>B. cinerea</i> [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1 Linie 3	1	A	489	416	98	809	506	183	1,2
		B	534			329			
	2	A	332			409			
		B	308			476			
30I-8_M1S1 Linie 6	1	A	61	54	17	366	232	85	4,3
		B	39			228			
	2	A	36			133			
		B	78			200			
30I-8_M1S1 Linie 8	1	A	36	23	14	126	93	63	4,0
		B	38			179			
	2	A	8			24			
		B	12			44			
30I-8_M1S1 Linie 13	1	A	195	140	51	467	413	117	3,0
		B	86			491			
	2	A	91			212			
		B	186			484			
30I-8_M1S1 Linie 14	1	A	0	12	7	23	95	75	7,6
		B	17			70			
	2	A	14			65			
		B	19			222			
35S Linie 5	1	A	16.049	10.796	3.820	13.552	8.768	2.900	0,8
		B	6.169			5.775			
	2	A	8.341			8.186			
		B	12.624			7.557			
TATA Linie 5	1	A	16	15	10	28	29	15	1,9
		B	0			11			
	2	A	26			53			
		B	19			22			
4xD Linie 3	1	A	73	125	85	2.661	6.841	2.487	54,8
		B	62			8.665			
	2	A	94			8.784			
		B	270			7.255			

Anhang 13: Qualitative und quantitative GUS-Assays mit *Pto* DC3000 infizierten Blättern transgener 30I-8_M1S1-Linien




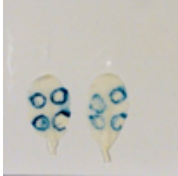


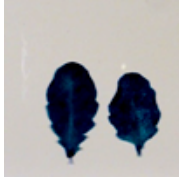
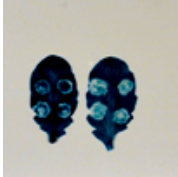




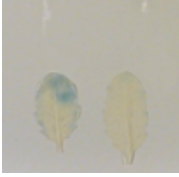



Die Färbungen bzw. Messungen wurden zwei Tage nach Infektion durchgeführt. Als Kontrollen dienen 4xD-GUS, 35S-GUS und TATA-GUS-Linien. Es wurden jeweils zwei Individuen einer Linie infiziert. Kontrolle: nicht infiziertes Blatt. *Pto* DC3000: infiziertes Blatt

GUS-Färbungen:

Experiment 1

	Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 (virulent)		Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 (virulent)
30I-8_M1S1 Linie 3			4xD		
30I-8_M1S1 Linie 6			35S		
30I-8_M1S1 Linie 8			TATA		
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					

Experiment 2

	Kontrolle	<i>Pto DC3000</i> (virulent)		Kontrolle	<i>Pto DC3000</i> (virulent)
30I-8_M1S1 Linie 3			4xD		
30I-8_M1S1 Linie 6			35S		
30I-8_M1S1 Linie 8			TATA		
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					

Quantitative GUS-Messungen:

Exp. : Experiment; Ind.: Individuum, Mittelw.: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung, Ind.faktor: Induktionsfaktor (Mittelwert Infiziert/Mittelwert Kontrolle)

Konstrukt /Linie	Exp.	Kontrolle		Mittelw.	Std. abw.	Pto DC3000		Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
		Ind.	[pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]			[pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]				
30I-8_M1S1 Linie 3	1	A	249	390	173	298	414	201	1,1	
		B	276			490				
	2	A	587			409				
		B	144			62				
	3	A	558			709				
		B	528			518				
30I-8_M1S1 Linie 6	1	A	77	53	21	154	66	50	1,2	
		B	49			97				
	2	A	10			16				
		B	63			18				
	3	A	62			33				
		B	58			78				
30I-8_M1S1 Linie 8	1	A	11	8	6	12	17	17	2,2	
		B	18			40				
	2	A	5			10				
		B	8			1				
	3	A	0			0				
		B	5			39				
30I-8_M1S1 Linie 13	1	A	167	230	127	726	256	224	1,1	
		B	497			327				
	2	A	114			84				
		B	262			110				
	3	A	192			143				
		B	150			145				
30I-8_M1S1 Linie 14	1	A	29	8	10	53	14	18	1,9	
		B	0			12				
	2	A	0			0				
		B	10			2				
	3	A	7			14				
		B	0			5				


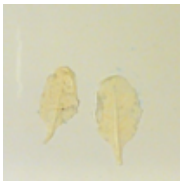

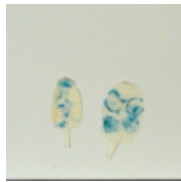


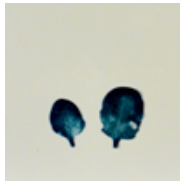
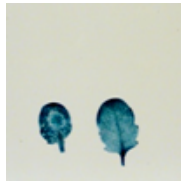



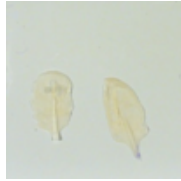




Anhang

Konstrukt /Linie	Kontrolle				Pto DC3000				
	Exp.	Ind.	[pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	[pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
35S Linie 5	1	A	8.932	7.599	2.726	8.932	5.778	2.874	0,8
		B	8.254			5.213			
	2	A	3.730			0			
		B	8.254			6.629			
	3	A	4.592			5.840			
		B	11.835			8.052			
TATA Linie 5	1	A	7	10	4	15	9	6	0,9
		B	13			12			
	2	A	4			0			
		B	8			0			
	3	A	15			16			
		B	12			11			
4xD Linie 5	1	A	0	12	11	2.137	1.718	1.349	146,1
		B	0			4.476			
	2	A	20			1.088			
		B	16			364			
	3	A	29			806			
		B	7			1.440			

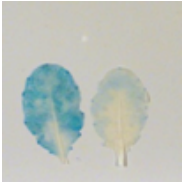

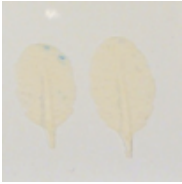
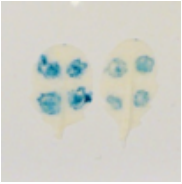
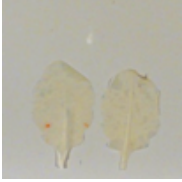
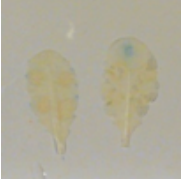
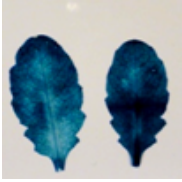
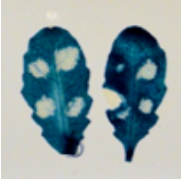





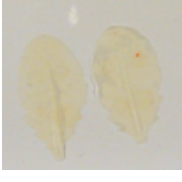
Anhang 14: Qualitative und quantitative GUS-Assays mit *Pto* DC3000 *avrRPM1* infizierten Blättern transgener 30I-8_M1S1-Linien

Die Färbungen bzw. Messungen wurden zwei Tage nach Infektion durchgeführt. Als Kontrollen dienen 4xD-GUS, 35S-GUS und TATA-GUS-Linien. Es wurden jeweils zwei Individuen einer Linie infiziert. Kontrolle: nicht infiziertes Blatt. *Pto* DC3000 *avrRPM1*: infiziertes Blatt

GUS-Färbungen:

Experiment 1	Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (avirulent)		Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (avirulent)
30I-8_M1S1 Linie 3			4xD		
30I-8_M1S1 Linie 6			35S		
30I-8_M1S1 Linie 8			TATA		
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					

Experiment 2

	Kontrolle	<i>Pto DC3000</i> <i>avrRPM1</i> (avirulent)		Kontrolle	<i>Pto DC3000</i> <i>avrRPM1</i> (avirulent)
30I-8_M1S1 Linie 3			4xD		
30I-8_M1S1 Linie 6			35S		
30I-8_M1S1 Linie 8			TATA		
30I-8_M1S1 Linie 13					
30I-8_M1S1 Linie 14					

Quantitative GUS-Messungen:

Exp. : Experiment; Ind.: Individuum, Mittelw.: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung, Ind.faktor: Induktionsfaktor (Mittelwert Infiziert/Mittelwert Kontrolle)

Konstrukt/ Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Pto DC3000 avrRPM1 [pmol 4- MU*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1 Linie 3	1	A	114	236	117	502	639	358	2,7
		B	325			862			
	2	A	308			527			
		B	45			184			
	3	A	262			1.308			
		B	364			452			
30I-8_M1S1 Linie 6	1	A	48	49	26	104	131	70	2,7
		B	40			160			
	2	A	37			89			
		B	29			15			
	3	A	107			211			
		B	36			208			
30I-8_M1S1 Linie 8	1	A	22	9	12	104	32	33	3,5
		B	24			25			
	2	A	14			12			
		B	3			26			
	3	A	0			14			
		B	-7			12			
30I-8_M1S1 Linie 13	1	A	56	119	75	223	194	56	1,6
		B	59			190			
	2	A	144			126			
		B	55			126			
	3	A	138			287			
		B	265			211			
30I-8_M1S1 Linie 14	1	A	11	3	4	86	21	30	/
		B	5			21			
	2	A	0			11			
		B	0			7			
	3	A	0			0			
		B	0			1			

Anhang


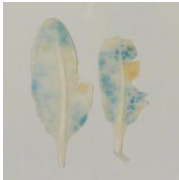
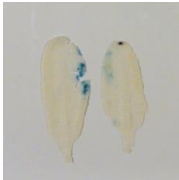
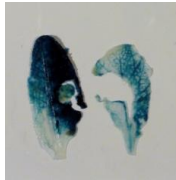

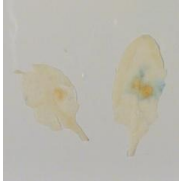
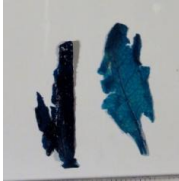
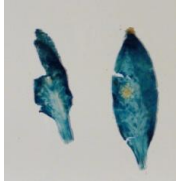
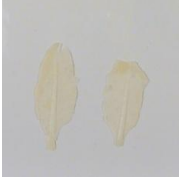
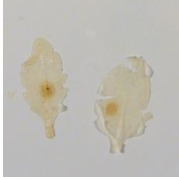

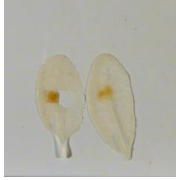

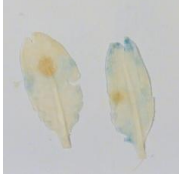
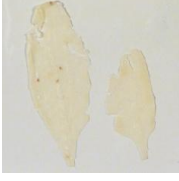
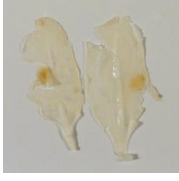
Konstrukt/ Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Pto DC3000 avrRPM1 [pmol 4- MU*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
35S Linie 5	1	A	2.649	6.778	3.554	2.649	5.350	2.466	0,8
		B	5.921			5.795			
	2	A	6.081			5.723			
		B	5.921			2.321			
	3	A	14.256			9.756			
		B	5.840			5.857			
TATA Linie 5	1	A	3	3	3	11	7	5	/
		B	9			15			
	2	A	5			9			
		B	4			6			
	3	A	0			4			
		B	0			0			
4xD Linie 5	1	A	6	62	112	4.081	2.584	1.142	41,9
		B	6			2.990			
	2	A	310			571			
		B	11			1.904			
	3	A	36			2.433			
		B	0			3.524			

Anhang 15: Qualitative und quantitative GUS-Assays mit *B. cinerea* infizierten Blättern transgener 27D-10_M1S2-Linien

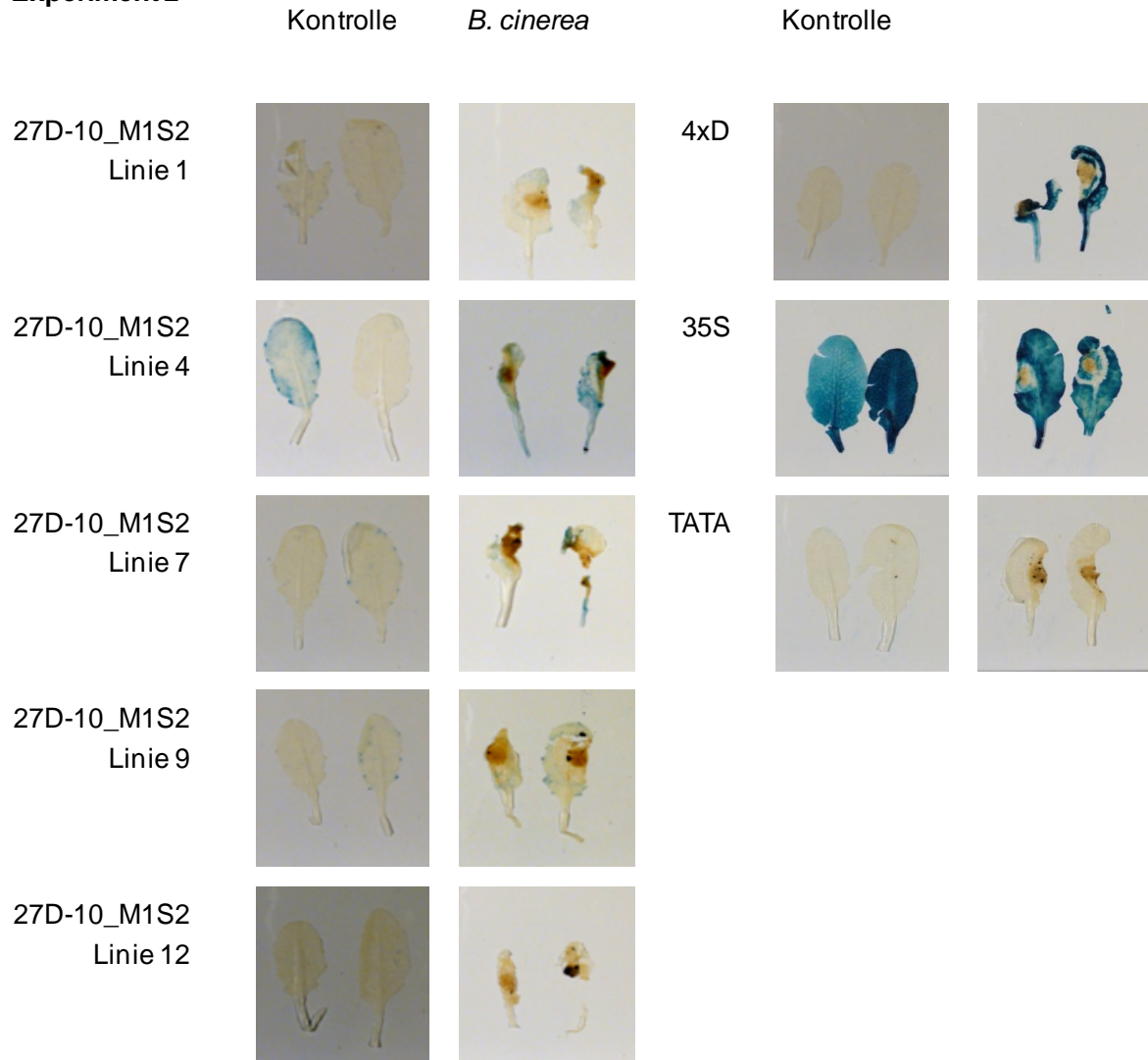
Die Färbungen bzw. Messungen wurden drei Tage nach Infektion durchgeführt. Als Kontrollen dienen 4xD-GUS, 35S-GUS und TATA-GUS-Linien. Es wurden jeweils zwei Individuen einer Linie infiziert. Kontrolle: nicht infiziertes Blatt. *B. cinerea*: infiziertes Blatt

GUS-Färbungen:

Experiment 1

	Kontrolle	<i>B. cinerea</i>		Kontrolle	<i>B. cinerea</i>
27D-10_M1S2 Linie 1			4xD		
27D-10_M1S2 Linie 4			35S		
27D-10_M1S2 Linie 7			TATA		
27D-10_M1S2 Linie 9					
27D-10_M1S2 Linie 12					

Experiment 2



Quantitative GUS-Messungen:

Exp. : Experiment; Ind.: Individuum, Mittelw.: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung, Ind.faktor: Induktionsfaktor (Mittelwert Infiziert/Mittelwert Kontrolle)

Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	<i>B. cinerea</i> [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 Linie 1	1	A	29	145	160	149	333	190	2,3
		B	417			618			
	2	A	27			174			
		B	107			391			
27D-10_M1S2 Linie 4	1	A	321	138	117	696	587	187	4,2
		B	7			329			
	2	A	153			820			
		B	72			503			

Anhang



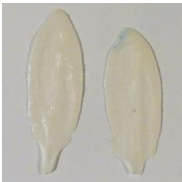
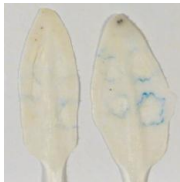


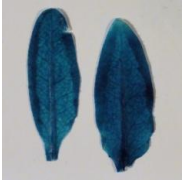
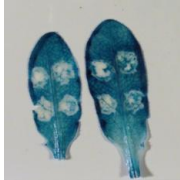








Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	<i>B. cinerea</i> [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 Linie 7	1	A	0	32	43	714	450	291	14,1
		B	14			171			
	2	A	7			150			
		B	106			767			
27D-10_M1S2 Linie 9	1	A	17	41	31	613	399	133	9,7
		B	12			303			
	2	A	92			273			
		B	44			406			
27D-10_M1S2 Linie 12	1	A	0	25	26	0	25	38	1,0
		B	38			90			
	2	A	0			8			
		B	61			0			
35S Linie 5	1	A	3.587	7.731	4.838	3.587	7.343	3.146	0,9
		B	5.679			8.036			
	2	A	15.979			12.061			
		B	5.679			5.687			
TATA Linie 5	1	A	12	3	5	3	10	5	3,4
		B	0			10			
	2	A	0			18			
		B	0			10			
4xD Linie 3	1	A	590	189	238	1.450	5.126	4.356	27,1
		B	0			2.269			
	2	A	23			4.338			
		B	143			12.447			

Anhang 16: Qualitative und quantitative GUS-Assays mit *Pto* DC3000 infizierten Blättern transgener 27D-10_M1S2-Linien

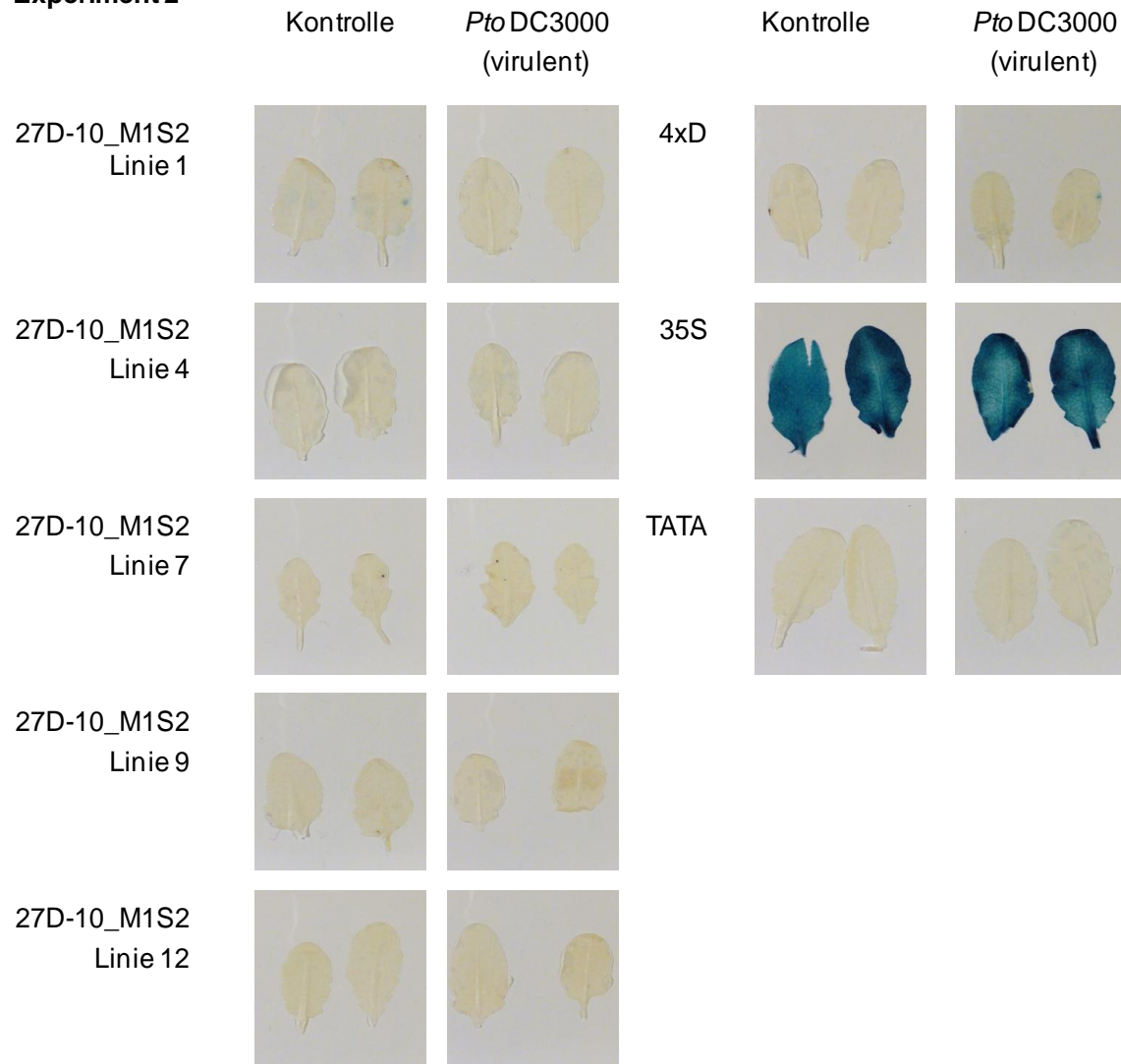
Die Färbungen bzw. Messungen wurden zwei Tage nach Infektion durchgeführt. Als Kontrollen dienen 4xD-GUS, 35S-GUS und TATA-GUS-Linien. Es wurden jeweils zwei Individuen einer Linie infiziert. Kontrolle: nicht infiziertes Blatt. *Pto* DC3000: infiziertes Blatt

GUS-Färbungen:

Experiment 1

	Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 (virulent)		Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 (virulent)
27D-10_M1S2 Linie 1			4xD		
27D-10_M1S2 Linie 4			35S		
27D-10_M1S2 Linie 7			TATA		
27D-10_M1S2 Linie 9					
27D-10_M1S2 Linie 12					

Experiment 2



Quantitative GUS-Messungen:

Exp. : Experiment; Ind.: Individuum, Mittelw.: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung, Ind.faktor: Induktionsfaktor (Mittelwert Infiziert/Mittelwert Kontrolle)

Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	<i>Pto</i> DC3000 [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 Linie 1	1	A	68	79	33	66	59	21	0,7
		B	46			58			
	2	A	68			26			
		B	134			85			
27D-10_M1S2 Linie 4	1	A	24	44	22	47	60	28	1,4
		B	22			29			
	2	A	76			104			
		B	52			59			

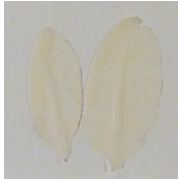


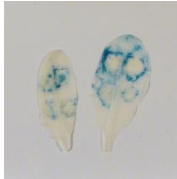


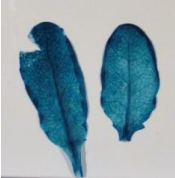


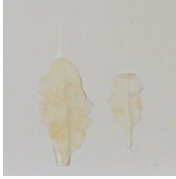

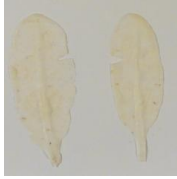

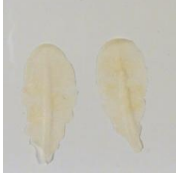


Anhang

Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Pto DC3000 [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 Linie 7	1	A	38	17	16	76	29	29	1,7
		B	4			0			
	2	A	0			15			
		B	29			26			
27D-10_M1S2 Linie 9	1	A	14	24	19	40	30	10	1,2
		B	47			19			
	2	A	0			21			
		B	37			40			
27D-10_M1S2 Linie 12	1	A	4	1	2	0	1	2	1,1
		B	0			0			
	2	A	0			5			
		B	0			0			
35S Linie 5	1	A	6.706	8.234	1.675	6.706	6.183	1.643	0,8
		B	9.906			3.728			
	2	A	6.419			6.004			
		B	9.906			8.295			
TATA Linie 5	1	A	0	2	3	9	4	3	/
		B	7			2			
	2	A	0			4			
		B	0			0			
4xD Linie 3	1	A	159	70	61	437	1.349	1.106	19,2
		B	0			99			
	2	A	94			2.146			
		B	29			2.715			

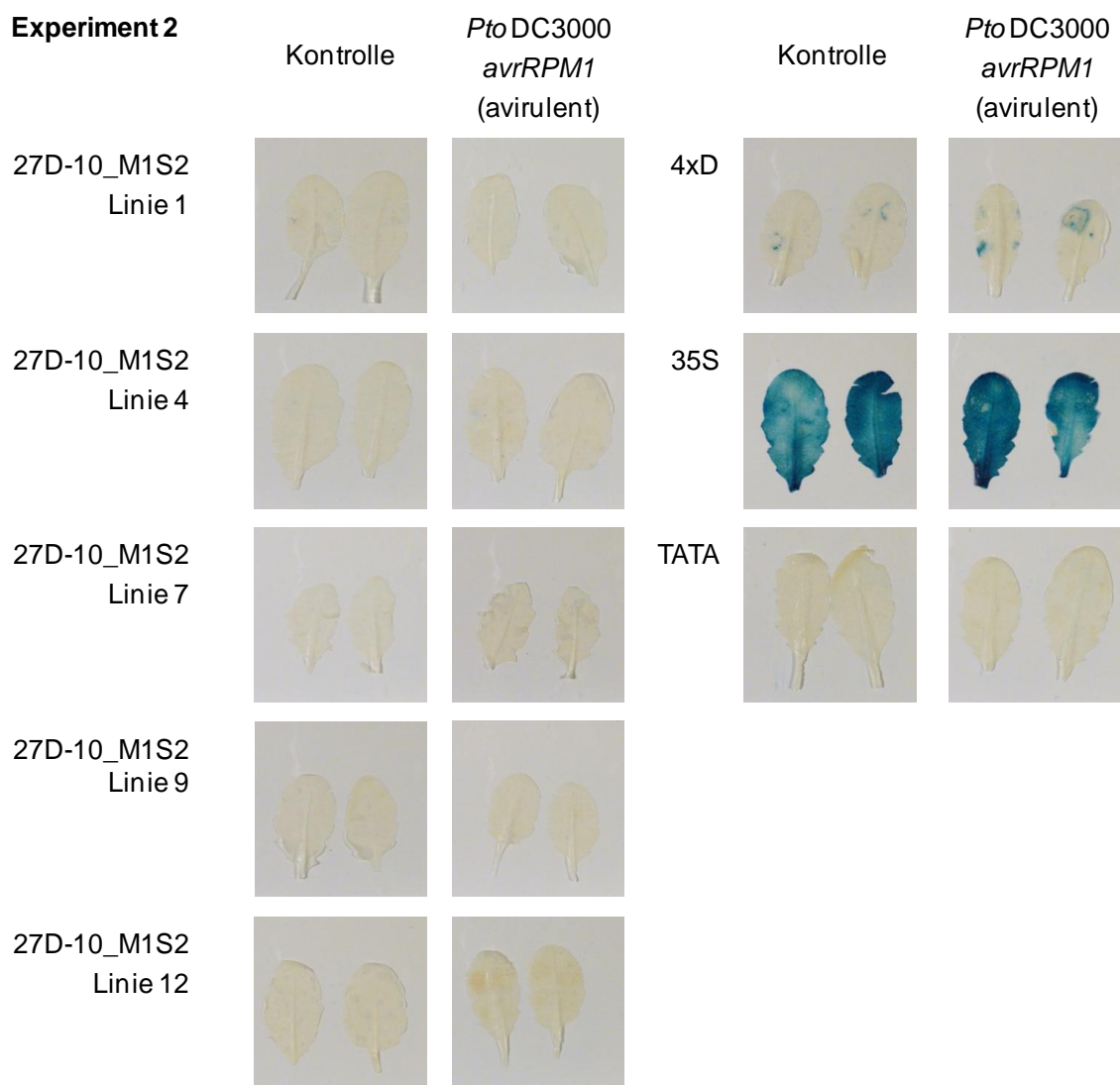
Anhang 17: Qualitative und quantitative GUS-Assays mit *Pto* DC3000 *avrRPM1* infizierten Blättern transgener 27D-10_M1S2-Linien

Die Färbungen bzw. Messungen wurden zwei Tage nach Infektion durchgeführt. Als Kontrollen dienen 4xD-GUS, 35S-GUS und TATA-GUS-Linien. Es wurden jeweils zwei Individuen einer Linie infiziert. Kontrolle: nicht infiziertes Blatt. *Pto* DC3000 *avrRPM1*: infiziertes Blatt

GUS-Färbungen:

Experiment 1	Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (avirulent)		Kontrolle	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> (avirulent)
27D-10_M1S2 Linie 1			4xD		
27D-10_M1S2 Linie 4			35S		
27D-10_M1S2 Linie 7			TATA		
27D-10_M1S2 Linie 9					
27D-10_M1S2 Linie 12					

Experiment 2



Quantitative GUS-Messungen:

Exp. : Experiment; Ind.: Individuum, Mittelw.: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung, Ind.faktor: Induktionsfaktor (Mittelwert Infiziert/Mittelwert Kontrolle)

Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRPM1</i> [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 Linie 1	1	A	31	59	36	84	167	63	2,8
		B	46			161			
	2	A	121			261			
		B	37			162			
27D-10_M1S2 Linie 4	1	A	49	56	18	88	117	97	2,1
		B	31			44			
	2	A	70			283			
		B	76			54			

Anhang

Konstrukt/Linie	Exp.	Ind.	Kontrolle [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Pto DC3000 avrRPM1 [pmol 4-MU* min ⁻¹ *mg ⁻¹]	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 Linie 7	1	A	3	15	12	12	18	23	1,2
		B	8			1			
	2	A	35			58			
		B	14			1			
27D-10_M1S2 Linie 9	1	A	21	33	13	25	43	29	1,3
		B	25			23			
	2	A	29			28			
		B	55			93			
27D-10_M1S2 Linie 12	1	A	4	4	6	5	7	5	1,5
		B	14			14			
	2	A	0			8			
		B	0			0			
35S Linie 5	1	A	4.254	11.850	6.467	4.254	9.502	6.035	0,8
		B	10.502			4.695			
	2	A	22.144			19.246			
		B	10.502			9.814			
TATA Linie 5	1	A	10	7	6	12	9	7	/
		B	4			5			
	2	A	0			19			
		B	15			0			
4xD Linie 3	1	A	10	124	206	1.056	1.906	1.706	15,3
		B	6			1.081			
	2	A	0			4.846			
		B	481			642			

Anhang 18: Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit WRKY70 und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in Petersilie-Protoplasten

Zur Kotransfektion von Petersilie-Protoplasten wurden pBT10GUS/LUC-Konstrukte und pORE-d35S-pA-Expressionsvektoren verwendet. Für jedes pBT10GUS/LUC-Konstrukt sind die Einzelwerte jedes Experiments (Exp.), sowie der Mittelwert (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) über alle Einzelwerte angegeben. Die normalisierte GUS-Aktivität nach Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor (-WRKY70) bzw. WRKY70-Expressionsvektor (+WRKY70) ist in pmol 4-MU*min⁻¹*mg⁻¹ angegeben. Der Induktionsfaktor (Ind.faktor) wird aus dem Verhältnis des +WRKY70-Mittelwerts zum -WRKY70-Mittelwert berechnet.

pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS/LUC	1	472	1.438	741	4.727	5.918	2.357	4,1
		621			5.396			
	2	984			4.319			
		1.173			5.456			
	3	543			3.768			
		726			5.088			
	4	1.197			6.302			
		1.179			5.761			
	5	1.370			7.273			
		2.018			8.936			
	6	1.801			8.431			
		2.200			5.517			
	7	1.242			5.591			
		1.437			5.627			
	8	1.209			6.861			
		948			3.700			
	9	1.412			3.716			
		2.032			5.093			
	10	1.430			7.514			
		1.047			9.854			
	11	2.018			6.016			
		2.438			14.219			
	12	1.581			5.635			
		2.507			9.376			
	13	1.687			6.448			
		2.011			6.608			
	14	570			1.158			
		648			1.286			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS/LUC	15	2.265			4.902			
		2.202			6.966			
	16	446			3.653			
		483			3.815			
	17	1.244			3.648			
		1.103			4.044			
	18	813			6.631			
		1.143			5.263			
	19	1.440			5.913			
		1.545			6.659			
	20	641			3.611			
		575			3.401			
	21	525			3.582			
		608			4.997			
	22	1.259			4.739			
		2.835			8.150			
	23	4.292			7.892			
		2.289			7.790			
	24	1.088			5.115			
		1.452			7.712			
	25	1.485			5.443			
		751			6.519			
	26	1.288			3.420			
		1.272			3.587			
	27	2.610			11.174			
		3.037			11.031			
	28	1.692			4.117			
		1.197			3.956			
	29	1.684			8.596			
		1.660			7.269			

Anhang

30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1- pBT10GUS/LUC	1	689	3.187	1.855	46.951	31.466	10.271	9,9
		992			48.761			
		777			42.358			
		784			51.706			
	2	1.415			33.534			
		1.889			52.080			
		1.263			38.435			
		1.654			40.266			
	3	512			30.991			
		654			31.486			
	4	2.824			23.424			
		4.082			42.392			
	5	2.783			26.820			
		3.315			43.793			
	6	5.312			19.208			
		3.747			23.651			
	7	4.568			23.810			
		6.827			32.950			
	8	2.792			16.537			
		2.377			16.220			
	9	2.075			21.050			
		2.227			18.032			
	10	3.571			21.535			
		5.433			26.382			
	11	4.511			29.108			
		4.889			32.283			
	12	4.011			26.824			
		4.580			29.989			
	13	4.912			30.191			
		4.497			37.119			
	14	6.042			21.543			
		7.557			44.210			
	15	2.721			23.950			
		2.082			22.258			

Anhang

30I-8_M1S1-mut3 bis -mut14-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1_mut3 pBT10GUS/LUC	1	1.252	1.226	429	21.577	14.278	4.848	11,6
		1.810			19.855			
		1.577			13.947			
		1.832			13.384			
	2	701	1.226	429	12.527	14.278	4.848	11,6
		861			17.588			
		852			8.547			
		926			6.803			
30I-8_M1S1_mut4 pBT10GUS/LUC	1	534	1.735	1.174	39.333	39.326	9.330	22,7
		723			32.627			
		605			42.437			
		736			46.716			
	2	2.657			28.976			
		3.826			37.384			
		2.103			28.732			
		2.694			58.406			
30I-8_M1S1_mut5 pBT10GUS/LUC	1	315	326	113	682	1.567	695	4,8
		296			1.497			
		193			847			
		203			1.151			
	2	266			1.270			
		350			1.952			
		554			2.309			
		435			2.832			
30I-8_M1S1_mut6 pBT10GUS/LUC	1	1.853	3.016	603	67.004	73.748	23.158	24,5
		2.722			84.453			
		2.710			57.311			
		3.066			126.968			
	2	3.172			57.718			
		3.739			81.627			
		2.937			48.032			
		3.925			66.869			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30l-8_M1S1_mut7 pBT10GUS/LUC	1	1.842	2.210	452	37.104	24.724	8.145	11,2
		1.787			35.960			
		2.320			24.844			
		2.656			29.095			
	2	1.851			16.569			
		1.670			19.671			
		2.620			21.084			
		2.934			13.462			
30l-8_M1S1_mut8 pBT10GUS/LUC	1	1.423	1.387	485	7.193	8.016	2.864	5,8
		1.777			9.836			
		1.278			9.732			
		2.051			13.843			
	2	595			4.942			
		893			8.065			
		1.117			5.449			
		1.965			5.068			
30l-8_M1S1_mut9 pBT10GUS/LUC	1	2.845	3.475	3.350	4.028	6.439	1.646	1,9
		5.949			5.088			
		4.994			7.565			
		10.713			4.713			
	2	709			8.114			
		636			9.078			
		545			6.343			
		1.409			6.587			
30l-8_M1S1_mut10 pBT10GUS/LUC	1	1.452	1.128	511	9.291	20.682	8.336	18,3
		1.601			16.280			
		2.330			6.485			
		1.662			8.074			
	2	1.003			24.680			
		1.036			29.178			
		781			20.923			
		972			23.637			
	3	919			28.401			
		552			27.425			
		544			31.632			
		689			22.178			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30l-8_M1S1_mut11 pBT10GUS/LUC	1	1.190	2.316	708	34.115	34.652	5.143	15,0
		1.649			43.204			
		1.886			30.238			
		1.872			38.102			
	2	2.715			31.959			
		3.228			30.904			
		3.019			27.817			
		2.967			40.879			
30l-8_M1S1_mut12 pBT10GUS/LUC	1	357	1.247	798	3.928	7.755	2.816	6,2
		507			7.436			
		474			5.532			
		665			6.906			
	2	2.513			8.370			
		1.681			6.901			
		2.206			14.139			
		1.570			8.830			
30l-8_M1S1_mut13 pBT10GUS/LUC	1	973	1.396	442	4.977	6.346	1.351	4,5
		1.659			6.625			
		921			3.756			
		1.055			6.294			
	2	1.939			7.872			
		2.167			6.421			
		1.115			8.231			
		1.337			6.592			
30l-8_M1S1_mut14 pBT10GUS/LUC	1	2.084	2.311	543	15.828	31.627	7.645	13,7
		1.888			35.354			
		1.999			29.543			
		1.667			41.581			
	2	2.774			39.367			
		3.466			33.994			
		2.493			25.701			
		2.119			31.651			

Anhang

27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp. -WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC		4.489		8.907			
	1	3.979		13.054			
		3.329		7.472			
		4.426		9.556			
	2	2.727		23.953			
		4.097		22.639			
		3.643		19.480			
		4.634		17.412			
	3	11.769		37.385			
		10.928		57.055			
	4	6.285		28.152			
		7.249		35.477			
	5	1.979		32.507			
		1.849		49.659			
	6	4.696		26.378			
		8.394		30.801			
	7	5.533	2.418	42.618	32.870	13.488	5,7
		3.892		43.758			
	8	9.766		36.302			
		8.722		29.476			
	9	6.779		29.750			
		5.096		28.562			
	10	6.919		53.818			
		5.381		53.537			
	11	4.243		27.844			
		3.459		30.479			
	12	8.640		53.515			
		6.918		48.556			
	13	7.388		35.151			
		5.442		33.627			
	14	5.426		36.326			
		7.358		48.629			

Anhang

27D-10_M1S2 -mut1 und -mut4 bis -mut14-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 _mut1- pBT10GUS/LUC	1	3.207	3.475	277	72.259	58.556	9.617	16,8
		3.702			61.381			
		3.612			43.828			
		3.994			44.191			
	2	3.056	3.475	277	54.553	58.556	9.617	16,8
		3.320			66.926			
		3.441			61.845			
		3.471			63.462			
27D-10_M1S2 _mut4- pBT10GUS/LUC	1	718	3.365	2.172	5.950	7.666	1.350	2,3
		1.026			5.444			
		789			6.321			
		1.453			7.942			
	2	3.635	3.365	2.172	9.378	7.666	1.350	2,3
		5.912			8.898			
		3.513			8.345			
		4.972			9.492			
	3	8.202	3.365	2.172	7.262	7.666	1.350	2,3
		4.310			8.615			
		2.933			6.677			
		2.922						
27D-10_M1S2 _mut5- pBT10GUS/LUC	1	600	1.329	528	14.853	15.113	4.345	11,4
		708			21.152			
		654			20.757			
		682			20.004			
	2	1.516	1.329	528	11.373	15.113	4.345	11,4
		1.815			18.126			
		1.834			8.783			
		1.760			18.326			
	3	1.388	1.329	528	9.269	15.113	4.345	11,4
		1.670			10.425			
		1.993			15.306			
					12.978			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 _mut6- pBT10GUS/LUC	1	932	1.134	182	47.144	52.462	11.400	46,3
		1.380			55.136			
		1.138			59.894			
		1.337			73.166			
	2	1.163			52.800			
		1.137			57.778			
		1.195			35.012			
		791			38.769			
		1.080			37.285			
		1.582			49.506			
27D-10_M1S2 _mut7- pBT10GUS/LUC	1	1.374	1.326	185	50.562	40.371	8.530	30,4
		1.517			47.189			
		1.095			46.070			
		1.268			35.169			
	2	1.506			27.637			
		1.186			29.550			
		1.708			41.864			
		1.765			41.382			
		1.997			30.024			
		1.678			41.694			
27D-10_M1S2 _mut8- pBT10GUS/LUC	1	1.523	1.549	269	20.537	29.880	9.782	19,3
		1.226			26.050			
		1.286			18.859			
		1.211			18.631			
	2	601			41.184			
		620			57.252			
		684			39.538			
		709			49.710			
		1.871			121.610			
		2.054			92.584			
27D-10_M1S2 _mut9- pBT10GUS/LUC	2	1.797	1.300	653	90.566	73.639	28.579	56,6
		2.066			96.664			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 _mut10- pBT10GUS/LUC	1	723	2.225	1.193	16.010	27.181	9.881	12,2
		1.079			23.461			
		1.143			11.758			
		1.285			20.971			
	2	3.596			39.735			
		3.535			38.504			
		3.530			33.291			
		2.904			33.722			
27D-10_M1S2 _mut11- pBT10GUS/LUC	1	2.089	2.810	469	92.741	77.548	11.257	27,6
		2.532			70.275			
		2.674			76.925			
		3.303			97.120			
	2	2.429			70.060			
		2.637			81.521			
		3.337			66.894			
		3.481			64.850			
27D-10_M1S2 _mut12- pBT10GUS/LUC	1	6.185	5.292	552	50.150	46.582	7.559	8,8
		5.597			42.441			
		4.667			51.006			
		4.756			52.670			
	2	5.776			59.275			
		5.627			39.411			
		5.139			34.465			
		4.588			43.237			
27D-10_M1S2 _mut13- pBT10GUS/LUC	1	5.189	6.217	1.121	65.788	81.541	16.533	13,1
		8.668			84.558			
		4.878			68.436			
		5.425			108.207			
	2	6.428			109.236			
		6.492			72.279			
		6.791			69.856			
		5.861			73.963			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2 _mut14- pBT10GUS/LUC	1	3.786	3.188	544	26.108	28.896	7.369	9,1
		3.744			20.912			
		2.417			18.588			
		2.803			21.804			
	2	3.919	3.188	544	34.525	28.896	7.369	9,1
		3.105			37.181			
		3.187			34.538			
		2.544			37.508			

Anhang 19: Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit WRKY70 und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in *Arabidopsis*-Protoplasten

Zur Kotransfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten wurden pBT10GUS-Konstrukte und pORE-d35S-pA-Expressionsvektoren verwendet. Für jedes pBT10GUS-Konstrukt sind die Einzelwerte jedes Experiments (Exp.) sowie der Mittelwert (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) über alle Einzelwerte angegeben. Die normalisierte GUS-Aktivität nach Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor (-WRKY70) bzw. WRKY70-Expressionsvektor (+WRKY70) ist in pmol 4-MU*min⁻¹ angegeben. Der Induktionsfaktor (Ind.faktor) wird aus dem Verhältnis des +WRKY70-Mittelwerts zum -WRKY70-Mittelwert berechnet.

pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS	1	0,6	0,5	0,5	0,8	1,7	1,0	3,6
		0,7			1,6			
	2	0,8			3,7			
		0,0			2,9			
	3	0,0			2,3			
		0,0			0,2			
	4	1,7			2,0			
	5	0,2			0,8			
	6	0,3			1,4			

30I-8_M1S1-pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-pBT10GUS	1	17,2	11,4	5,3	39,6	47,6	20,8	4,2
		14,3			26,6			
	2	12,5			108,1			
		21,6			75,6			
	3	22,9			40,9			
		11,4			40,9			
	4	5,0			44,9			
		7,3			32,8			
		9,0			41,0			
	5	9,1			35,3			
		6,4			39,6			
		5,9			26,7			
	6	9,4			66,3			
		8,7			57,4			
		10,1			38,8			

30I-8_M1S1 -mut4 und -mut10 bis -mut14-pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-mut4 pBT10GUS	1	3,4	1,9	0,9	33,4	27,3	10,0	14,2
		3,4			45,0			
		2,5			36,1			
	2	1,3			14,5			
		1,2			18,1			
		0,8			17,9			
		2,3			35,9			
	3	1,5			25,3			
		1,0			19,9			
30I-8_M1S1-mut10 pBT10GUS	1	0,4	0,4	0,2	9,2	6,9	1,7	15,7
		0,5			7,7			
		1,0			6,2			
	2	0,5			6,0			
		0,3			3,8			
		0,2			5,5			
		0,3			6,9			
	3	0,5			7,1			
		0,4			9,6			
30I-8_M1S1-mut11 pBT10GUS		2,6	3,3	0,8	31,8	26,9	11,0	8,3
		3,2						
		3,4						
		2,3			14,1			
		2,8			15,5			
		2,6			14,8			
		4,6			31,1			
		4,7			41,1			
		3,0			40,0			
30I-8_M1S1-mut12 pBT10GUS		2,6	1,2	0,5	3,0	2,5	0,7	2,0
		1,1			2,4			
		0,8			3,3			
		0,7			1,0			
		1,2			2,0			
		1,2			1,8			
		1,2			3,5			
		1,1			2,5			
		1,3			2,8			

Anhang

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-mut13 pBT10GUS		0,7	0,8	0,2	1,7	2,4	1,4	3,0
		0,8			5,5			
		0,7			3,7			
		1,0			1,1			
		0,6			1,0			
		0,4			1,2			
		1,3			2,2			
		1,0			3,1			
		0,7			1,8			
30I-8_M1S1-mut14 pBT10GUS		2,3	2,6	0,4	46,1	37,5	9,2	14,6
		3,0			28,3			
		2,9			46,0			
		2,8			32,0			
		1,7			22,9			
		2,2			30,8			
		3,0			34,5			
		2,5			48,7			
		2,7			48,1			

27D-10_M1S2-pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	+WRKY70	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2-pBT10GUS	1	24,2	40,2	8,5	37,6	78,2	28,0	1,9
		42,8			86,0			
	2	43,5			114,5			
		41,0			110,1			
	3				65,4			
		49,6			55,8			

Anhang 20: Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit SPL7 und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in Petersilie-Protoplasten

Zur Kotransfektion von Petersilie-Protoplasten wurden pBT10GUS/LUC-Konstrukte und pORE-d35S-pA-Expressionsvektoren verwendet. Für jedes pBT10GUS/LUC-Konstrukt sind die Einzelwerte jedes Experiments (Exp.) sowie der Mittelwert (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) über alle Einzelwerte angegeben. Die normalisierte GUS-Aktivität nach Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor (-SPL7) bzw. SPL7-Expressionsvektor (+SPL7) ist in $\text{pmol 4-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ angegeben. Der Induktionsfaktor (Ind.faktor) wird aus dem Verhältnis des +SPL7-Mittelwerts zum -SPL7-Mittelwert berechnet.

pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS/LUC	1	606	1.086	409	1.116	1.404	376	1,3
		640			998			
	2	659			1.038			
		922			1.142			
	3	1.279			1.824			
		1.593			2.100			
	4	1.305			1.500			
		1.682			1.519			

30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC	1	1.061	1.905	1.150	27.235	29.322	7.032	15,4
		1.427			28.356			
		1.102			28.646			
		1.017			25.267			
	2	1.462			34.859			
		1.826			32.007			
		956			15.025			
		1.070			21.312			
	5	2.082			33.955			
		2.444			33.189			
	6	3.584			42.695			
		4.828						

Anhang

30I-8_M1S1-mut4 und -mut6-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-mut4-pBT10GUS/LUC	1	1.644	2.484	571	61.809	83.086	25.108	33,4
		1.764			85.744			
		2.343			66.075			
		2.245			64.087			
	2	2.980	2.484	571	75.336	83.086	25.108	33,4
		3.459			143.498			
		2.729			94.600			
		2.709			73.539			
30I-8_M1S1-mut6-pBT10GUS/LUC	1	2.265	2.829	684	3.715	5.870	2.111	2,1
		3.445			5.166			
		1.880			3.748			
		2.472			3.712			
	2	2.314			7.211			
		3.755			10.157			
		2.734			6.753			
		3.770			6.502			

27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC	1	2.341	3.173	683	4.607	5.302	879	1,7
		3.150			5.232			
		3.207			4.601			
		3.702			5.075			
	2	2.383			4.923			
		3.211			7.008			
		2.802			4.479			
		4.586			6.496			

Anhang 21: Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit SPL7 und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in *Arabidopsis*-Protoplasten

Zur Kotransfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten wurden pBT10GUS-Konstrukte und pORE-d35S-pA-Expressionsvektoren verwendet. Für jedes pBT10GUS-Konstrukt sind die Einzelwerte jedes Experiments (Exp.) sowie der Mittelwert (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) über alle Einzelwerte angegeben. Die normalisierte GUS-Aktivität nach Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor (-SPL7) bzw. SPL7-Expressionsvektor (+SPL7) ist in pmol 4-MU*min⁻¹ angegeben. Der Induktionsfaktor (Ind.faktor) wird aus dem Verhältnis des +SPL7-Mittelwerts zum -SPL7-Mittelwert berechnet.

pBT10-GUS:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS	1	0,6	0,3	0,4	1,5	1,3	0,7	3,8
		0,7			1,5			
	2	0,8			2,6			
		0,0			1,2			
	3	0,0			0,5			
		0,0			0,8			

30I-8_M1S1-pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-pBT10GUS	1	17,2	16,6	4,4	247,9	299,5	114,2	18,0
		14,3			217,7			
	2	12,5			402,3			
		21,6			505,2			
	3	22,9			193,6			
		11,4			230,3			

27D-10_M1S2-pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-SPL7	Mittelw.	Std. abw.	+SPL7	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2-pBT10GUS	1	24,2	40,2	8,5	56,9	63,9	10,5	1,6
		42,8			58,5			
	2	43,5			84,6			
		41,0			70,4			
	3				57,4			
		49,6			55,9			

Anhang 22: Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit JAG und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in Petersilie-Protoplasten

Zur Kotransfektion von Petersilie-Protoplasten wurden pBT10GUS/LUC-Konstrukte und pORE-d35S-pA-Expressionsvektoren verwendet. Für jedes pBT10GUS/LUC-Konstrukt sind die Einzelwerte jedes Experiments (Exp.) sowie der Mittelwert (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) über alle Einzelwerte angegeben. Die normalisierte GUS-Aktivität nach Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor (-JAG) bzw. JAG-Expressionsvektor (+JAG) ist in $\text{pmol 4-MU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ angegeben. Der Induktionsfaktor (Ind.faktor) wird aus dem Verhältnis des +JAG-Mittelwerts zum -JAG-Mittelwert berechnet.

pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-JAG	Mittelw.	Std. abw.	+JAG	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS/LUC	1	820	1.096	473	3.053	3.943	1.271	3,6
		836			2.823			
		727			2.945			
		672			3.486			
	2	1.745			5.204			
		1.777			6.146			

30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-JAG	Mittelw.	Std. abw.	+JAG	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC	1	1.893	2.894	1.049	8.298	12.519	5.362	4,3
		1.891			7.879			
		1.867			8.104			
		1.885			6.884			
	2	3.381			22.191			
		3.821			12.241			
		4.500			16.775			
		3.915			17.780			

27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC:

Konstrukt	Exp.	-JAG	Mittelw.	Std. abw.	+JAG	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC	1	3.057	3.882	1.200	7.602	10.719	3.545	2,8
		2.798			6.456			
		2.847			9.100			
		2.223			7.481			
	2	5.075			11.825			
		5.523			17.437			
		4.485			14.238			
		5.045			11.609			

Anhang 23: Einzelergebnisse der Kotransfektionsexperimente mit JAG und verschiedenen Reporter-genkonstrukten in *Arabidopsis*-Protoplasten

Zur Kotransfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten wurden pBT10GUS-Konstrukte und pORE-d35S-pA-Expressionsvektoren verwendet. Für jedes pBT10GUS-Konstrukt sind die Einzelwerte jedes Experiments (Exp.) sowie der Mittelwert (Mittelw.) und die Standardabweichung (Std.abw.) über alle Einzelwerte angegeben. Die normalisierte GUS-Aktivität nach Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor (-JAG) bzw. JAG-Expressionsvektor (+JAG) ist in pmol 4-MU*min⁻¹ angegeben. Der Induktionsfaktor (Ind.faktor) wird aus dem Verhältnis des +JAG-Mittelwerts zum -SPL7-Mittelwert berechnet.

pBT10GUS:

Konstrukt	Exp.	-JAG	Mittelw.	Std. abw.	+JAG	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
pBT10GUS	1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,4	0,2	2,8
		0,0			0,8			
		0,1			0,4			
	2	0,2			0,6			
		0,0			0,1			
		0,3			0,7			
	3	0,0			0,0			
		0,0			0,5			
		0,3			0,4			
	4	0,0			0,3			
		0,6			0,4			
		0,0			0,0			

30I-8_M1S1-pBT10GUS:

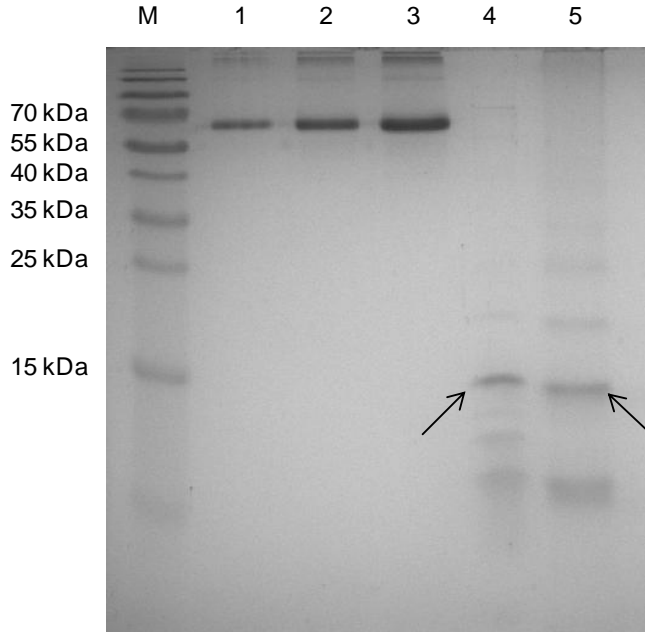
Konstrukt	Exp.	-JAG	Mittelw.	Std. abw.	+JAG	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
30I-8_M1S1-pBT10GUS	1	7,3	19,2	8,1	17,9	20,8	7,6	1,1
		12,5			17,9			
		4,5			19,8			
	2	13,9			35,0			
		21,9			31,6			
		19,2			33,3			
	3	23,5			17,9			
		23,9			18,8			
		21,4			13,7			
	4	19,9			17,4			
		28,7			11,2			
		33,5			15,4			

27D-10_M1S2-pBTGUS:

Konstrukt	Exp.	-JAG	Mittelw.	Std. abw.	+JAG	Mittelw.	Std. abw.	Ind. faktor
27D-10_M1S2- pBT10GUS	1	9,8	34,4	11,5	31,6	28,6	13,0	0,8
		17,4			18,2			
		22,2			24,8			
	2	44,5			46,7			
		43,6			48,1			
		49,0			54,6			
	3	35,6			20,7			
		37,0			18,2			
		35,4			23,8			
	4	37,9			21,8			
		34,4			20,7			
		45,9			14,3			

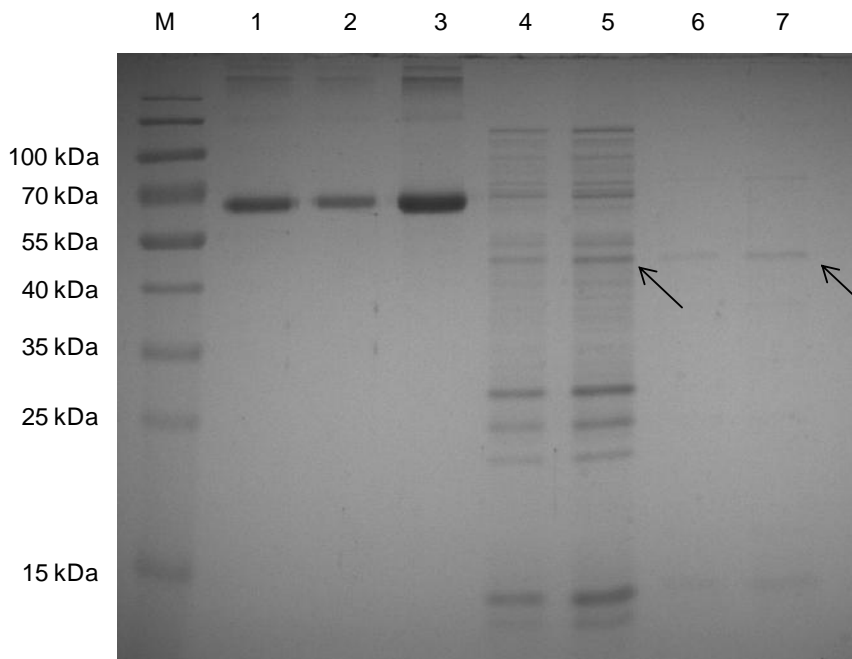
Anhang 24: Analyse und Konzentrationsbestimmung der verwendeten SPL7-DBD-Isolate

Zwei unabhängig hergestellte SPL7-DBD-Isolate wurden nach Dialyse gegen Gelshift-Bindungspuffer mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden verschiedene Mengen BSA-Protein auf demselben Gel aufgetragen. Mittels der Software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) wurde die Konzentration der mit Pfeilen markierten SPL7-DBD-Banden auf je ca. 50 ng/µl bestimmt. M: Marker; 1-3: 0,5, 1 und 2 µg BSA; 4+5: SPL7-DBD-Isolate.



Anhang 25: Analyse und Konzentrationsbestimmung der verwendeten WRKY70-Isolate

Zwei unabhängig hergestellte WRKY70-Isolate wurden nach Dialyse gegen Gelshift-Bindungspuffer mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden verschiedene Mengen BSA-Protein auf demselben Gel aufgetragen. Mittels der Software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) wurde die Konzentration der mit Pfeilen markierten WRKY70-Banden auf ca. 10 bzw. 5 ng/µl (Spur 5 und 7) bestimmt. M: Marker; 1-3: 1, 0,5 und 2 µg BSA; 4+5: 10 und 20 µl WRKY-Isolat 1; 6+7: 10 und 20 µl WRKY-Isolat 2.



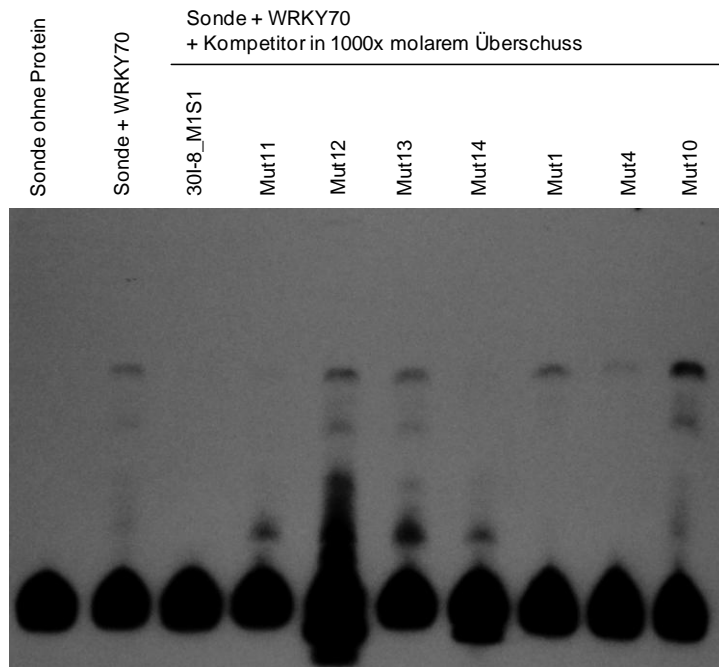
Anhang 26: Liste WRKY70-reprimierter und –induzierter Gene

Aus Microarray-Daten von Li *et al.* (2004) wurden die 100 in der WRKY70-Überexpressionslinie am stärksten reprimierten bzw. induzierten Gene extrahiert.

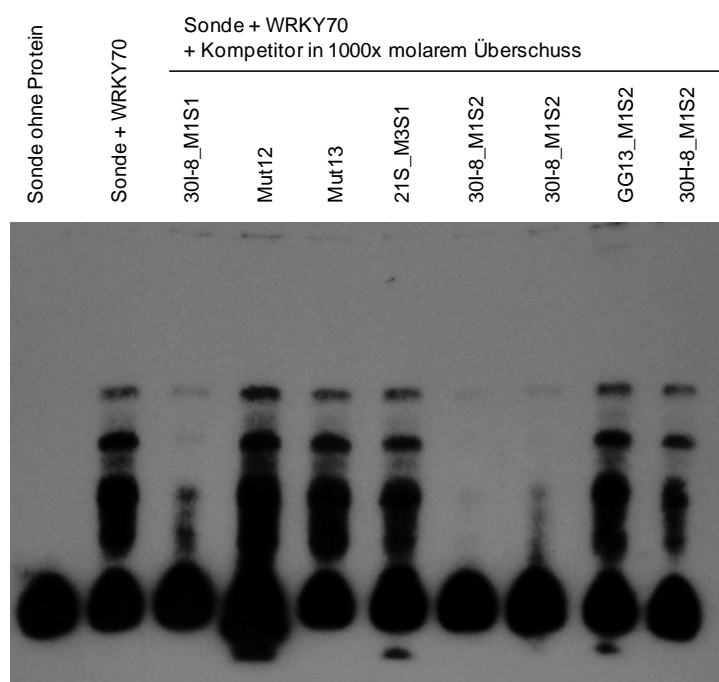
WRKY70-reprimierte Gene				WRKY70-induzierte Gene			
Nr.	AGI	Nr.	AGI	Nr.	AGI	Nr.	AGI
1	At3g05020	51	At2g47220	1	At1g65500	51	At3g49120
2	At3g22240	52	At4g35320	2	At2g43570	52	At4g29900
3	At2g14560	53	At3g54930	3	At4g01700	53	At4g33050
4	At1g27030	54	At4g23760	4	At3g57260	54	At4g15030
5	At2g01760	55	At4g14760	5	At1g45145	55	At1g30900
6	At5g36910	56	At3g48280	6	At3g48080	56	At1g08450
7	At2g32990	57	At1g20450	7	At4g29940	57	At2g37130
8	At4g18640	58	At4g08300	8	At4g01920	58	At4g37690
9	At5g07690	59	At1g77280	9	At2g44380	59	At5g57560
10	At3g50970	60	At4g16900	10	At3g13790	60	At4g03450
11	At2g21050	61	At2g43820	11	At5g57550	61	At1g23840
12	At4g29610	62	At4g02850	12	At2g21850	62	At2g17040
13	At1g53160	63	At4g00880	13	At4g35770	63	At3g57240
14	At2g34930	64	At4g35630	14	At2g44390	64	At1g14170
15	At2g38300	65	At2g46690	15	At3g15450	65	At4g01740
16	At4g21760	66	At4g28780	16	At1g75040	66	At4g15090
17	At1g76680	67	At4g10150	17	At4g37370	67	At3g52430
18	At1g04250	68	At1g01510	18	At4g04220	68	At2g15390
19	At1g60270	69	At4g03060	19	At1g28330	69	At1g03400
20	At1g19050	70	At5g51460	20	At2g31880	70	At4g01610
21	At2g29710	71	At4g23990	21	At2g47880	71	At2g24360
22	At2g28190	72	At3g21110	22	At1g05570	72	At1g21250
23	At2g38280	73	At3g26700	23	At2g32680	73	At3g26220
24	At2g32860	74	At1g02205	24	At2g33580	74	At3g08720
25	At1g12520	75	At2g43200	25	At2g17370	75	At1g03210
26	At1g05540	76	At4g38850	26	At2g22860	76	At2g02930
27	At4g37190	77	At2g22190	27	At2g24850	77	At4g17900
28	At2g14520	78	At1g23800	28	At1g11260	78	At1g34750
29	At2g28870	79	At2g28510	29	At4g23150	79	At4g21380
30	At4g23500	80	At1g04240	30	At4g30270	80	At5g03840
31	At4g28640	81	At4g37980	31	At4g20110	81	At4g23470
32	At2g39700	82	At2g43550	32	At1g05630	82	At2g18870
33	At1g78930	83	At2g44300	33	At4g02380	83	At4g28270
34	At3g57710	84	At2g28930	34	At2g25000	84	At2g40000
35	At5g10180	85	At2g22900	35	AtMg01410	85	At2g43150
36	At2g03710	86	At4g23790	36	At2g17120	86	At1g79450
37	At2g42530	87	At3g24800	37	At2g41410	87	At4g23540
38	At4g23690	88	At4g34650	38	At2g47130	88	At4g14020
39	At4g17750	89	At4g32350	39	At2g23430	89	At5g60900
40	At2g38630	90	At4g18580	40	At2g44790	90	At2g33530
41	At4g14480	91	At2g01730	41	At1g02920	91	At4g15760
42	At4g33950	92	At2g22170	42	At2g43760	92	At2g01650
43	At4g13180	93	At4g17180	43	At5g02490	93	At2g04690
44	At1g56170	94	At1g56670	44	At1g69490	94	At4g27450
45	At1g08750	95	At4g26790	45	At1g05300	95	At2g35940
46	At5g60890	96	At4g37280	46	At1g67330	96	At4g37260
47	At5g25980	97	At2g22980	47	At4g13900	97	At1g04280
48	At4g36180	98	At2g42740	48	At1g79380	98	At4g09460
49	At5g15230	99	At3g29160	49	At4g14390	99	At1g16260
50	At1g10450	100	At2g36120	50	At2g33830	100	At4g23810

Anhang 27: Unabhängig reproduzierte Gelshift-Experimente mit WRKY70 und 30l-8_M1S1

Unabhängige Reproduktion des in Abbildung 37 gezeigten Gelshift-Experiments:



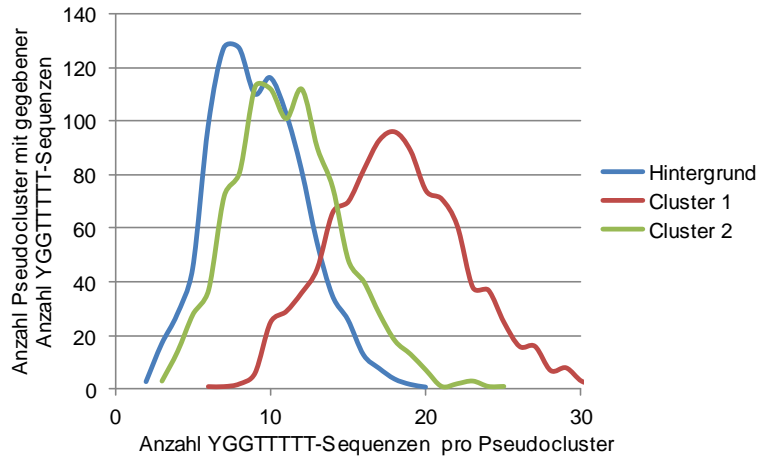
Unabhängige Reproduktion des in Abbildung 38 gezeigten Gelshift-Experiments:



Anhang 28: POBO-Analysen mit modifizierten Konsensussequenzen der WRKY70-TFBS

Analog zum unter Kapitel 5.13 beschriebenen Vorgehen wurde das Auftreten modifizierter Konsensussequenzen der WRKY70-TFBS in WRKY70-responsiven Genen untersucht.

Sequenz YGGTTTTT:



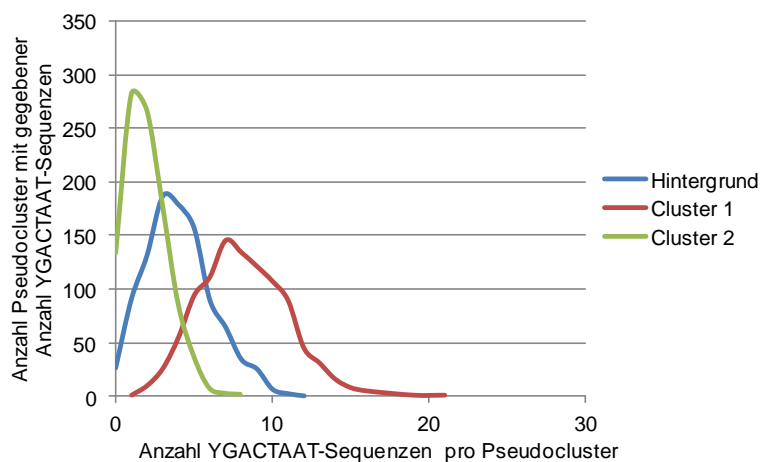
t-Test Statistiken

t-Test	t-Wert	Freiheitsgrade	p-Wert
Cluster 1 - Hintergrund	52,78	1998	<0,0001
Cluster 2 – Hintergrund	12,8	1998	<0,0001
Cluster 1 – Cluster 2	-39,37	1998	<0,0001

ANOVA-Varianzanalyse

F-Wert	1604,7
--------	--------

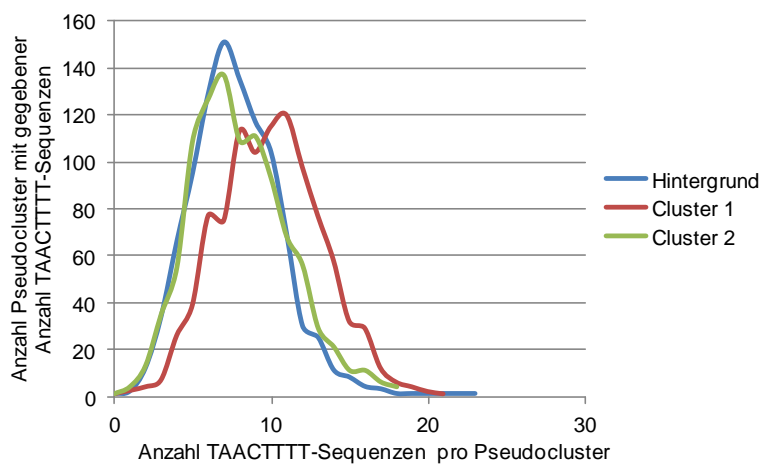
Sequenz YGACTAAT:



t-Test Statistiken			
t-Test	t-Wert	Freiheitsgrade	p-Wert
Cluster 1 - Hintergrund	36,17	1998	<0,0001
Cluster 2 – Hintergrund	-25,14	1998	<0,0001
Cluster 1 – Cluster 2	-61,9	1998	<0,0001

ANOVA-Varianzanalyse	
F-Wert	2000,64

Sequenz TAACTTTT:



t-Test Statistiken			
t-Test	t-Wert	Freiheitsgrade	p-Wert
Cluster 1 - Hintergrund	16,8	1998	<0,0001
Cluster 2 – Hintergrund	1,8	1998	0,072
Cluster 1 – Cluster 2	-13,85	1998	<0,0001

ANOVA-Varianzanalyse	
F-Wert	156,2

Anhang 29: Alignment aller Klasse III WRKY-Domänen aus *A. thaliana*

Vollständig konservierte Aminosäuren sind in rot gezeigt, nicht vollständig konservierte Aminosäuren in blau.

			20		40		60	
AtWRKY30	VDRT-LDDGF	SWRKYGQKD	I	LGAKFPRGY	RCTYRKSQGC	EATKQVQRSD	ENQMLLEISY	RGIHSCSQA 68
AtWRKY38	SPDP-IYYDGY	LWRKYGQKS	I	KKSNHQRSYY	RCSYNKDHC	EARKHEQKIK	DNPPVYRTTY	FGHTCKTE 69
AtWRKY41	LEGP-HDDIF	SWRKYGQKD	I	LGAKFPRSY	RCTFRNTQYC	WATKQVQRSD	GDPTIFEVY	RGHTCSQG 68
AtWRKY46	QENGSI DDGH	CWRKYGQKE	I	HGSKNPRAY	RCTHRFTQDC	LAVKQVQKSD	TDP SLFEVKY	LGNHTCNNI 69
AtWRKY52	IPAIDEGDLW	TWRKYGQKD	I	LGSRFPRGY	RCAYKFTHGC	KATKQVQRSE	TDSNMLAIT	LSEHNHPRP 69
AtWRKY53	LEGP-QDDVF	SWRKYGQKD	I	LGAKFPRSY	RCTHRSTQNC	WATKQVQRSD	GDATVFEVY	RGHTCSQA 68
AtWRKY54	VEAKSSEDRY	AWRKYGQKE	I	LNTTFPRSY	RCTHKPTQGC	KATKQVQKQD	QDSEMFQITY	IGYHTCTAN 69
AtWRKY55	NTDLPPDDNH	TWRKYGQKE	I	LGSRFPRAY	RCTHQKLYNC	PAKKQVQRLN	DDPFTFRVTY	RGSHTCYNS 69
AtWRKY62	SSTPIYHDFG	LWRKYGQKI	I	KESEYQRSY	KCAYTKDQNC	EAKKQVQKIQ	HNPPLYSTTY	FGQHICQLH 69
AtWRKY63	SPNPRDDGF	TWRKYGQKI	I	KTSLYQRCY	RCAYAKDQNC	YATKRVQMIQ	DSPPVYRTTY	LGQHTCKAF 69
AtWRKY64	SPTPRDDGF	TWRKYGQKI	I	KTSPYQRCY	RCTYAKDQNC	NARKRVQMIQ	DNPPVYRTTY	LGKHVCKAV 69
AtWRKY66	SPTPAHIDGF	IWRKYGQKI	I	KTSPHQRWY	RCAYAKDQNC	DATKRVQKIQ	DNPPVYRTTY	VGQHACEAP 69
AtWRKY67	SRTMCPNDGF	TWRKYGQKI	I	KASAHKRCY	RCTYAKDQNC	NATKRVQKIK	DNPPVYRTTY	LGKHVCKAF 69
AtWRKY70	IESTILED AF	SWRKYGQKE	I	LNAKFPRSY	RCTHKYTQGC	KATKQVQKVE	LEPKMFSITY	IGNHTCNTN 69

Anhang 30: WRKY70 weist kaum Unterschiede zur Konsensussequenz der Klasse III WRKY-Domänen auf

Die gezeigte Konsensussequenz beruht auf den Aminosäuren, die in 80 % der in Anhang 29 aufgeführten WRKY-Domänen konserviert sind (rot). Nicht konservierte Aminosäuren sind mit X gekennzeichnet. WRKY70 weicht nur an Position 30 (F statt Y) von der Konsensussequenz ab.

Konsensus	XXXXXXXXDXXXWRKYGQKXI XXXXXXRXYYRCXXXXXXXXCXAXKXVQXXXXXXXXXXXXTYXGXHCXXX
AtWRKY70	IESTILED AF S W R K Y G Q K E I L N A K F P R S Y F R C T H K Y T Q G C K A T K Q V Q K V E L E P K M F S I T Y I G N H T C N T N

10. Materiallisten

10.1. Glycerinkulturen und DNA-Konstrukte

Verwendet Bakterien-, Hefe- und Pilzstämmen:

Glycerinkultur	Name	Beschreibung/Selektion	Kapitel
4067	<i>A. tumefaciens</i> C58C1	Carb ^R , Rif ^R	4.11.9
3708	<i>B. cinerea</i> B05.10		4.11.36
3275	<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF ⁺	Tet ^R	4.11.9
3907	<i>E. coli</i> M15 [pRep4]	Expressionsstamm, Kan ^R	4.11.10
3559	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (pVSP61_empty)	Virulenter <i>Pto</i> DC3000 Stamm mit pVSP61_empty, Kan ^R , Rif ^R	4.11.36
3558	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 pVSP61_avrRPM1	Avirulenter <i>Pto</i> DC3000 Stamm mit pVSP61_avrRPM1. Kan ^R , Rif ^R	4.11.36
3794	<i>S. cerevisiae</i> Y1H Gold	Hefestamm für Yeast One-Hybrid-Screening	4.11.28

Verwendete Plasmide:

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
2436	3269	35S-pGPTV_bar	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.35
3504	6949	4x27D-10_M1S2-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
3828	5768	4x27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
3089	6948	4x30I-8_M1S1-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
4361	6809	4x30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
4380	6430	4xD-pBT10-GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
4168	6435	p70S-Luc	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.20
3173	4914	pBT10-GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
3824	5760	pBT10GUS-d35S-LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.35
2766	5365	pCR2.1	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.18

Materiallisten

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
3225	6945	pGPTV_bar	T-DNA-Vektor in XL1 Blue MRF ^R , Kan ^R	4.11.35
3655	5364	pORE-O2	T-DNA-Vektor in XL1-Blue MRF ^R , Kan ^R	4.11.20
4377	6950	pQE30	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.19
4378	6952	pQE31	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.19
4379	6951	pQE32	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.19
3430	6947	pRT101-LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.34
/	5870	TF-only cDNA-Bank	cDNA-Bank in pDEST_GAD424 (Mitsuda <i>et al.</i> , 2010). ca. 0,5 ug/ul. Original-DNA aus Japan. Carb ^R	4.11.30

Erstellte Plasmide und Stämme:

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
4017	6194	pORE-O2-d35S-pA	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.20
4111	6337	pORE-O2-d35S-pA-cmyc	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.20
4382	/	pORE-O2-d35S-pA	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.35
4383	/	pORE-O2-d35S-pA-cmyc	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.35
4038		p53His2 + pGAD-Rec2-53 [Y1HGold]	in Y1HGold, Positivkontrolle f. Yeast One-Hybrid, SD –Leu/-Trp	5.4
4039		pHis2.1 + pGAD-Rec2-53 [Y1HGold]	in Y1HGold, Negativkontrolle f. Yeast One-Hybrid, SD –Leu/-Trp	5.4
4215	6637	1x30l-8_M1S1_mut1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4216	6638	2x30l-8_M1S1_mut1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4217	6639	4x30l-8_M1S1_mut1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4218	6640	1x30l-8_M1S1_mut2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4219	6641	2x30l-8_M1S1_mut2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4220	6642	4x30l-8_M1S1_mut2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16

Materiallisten

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
4221	6643	1x30l-8_M1S1_mut3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4222	6644	2x30l-8_M1S1_mut3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4223	6645	4x30l-8_M1S1_mut3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4224	6646	1x30l-8_M1S1_mut4-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4225	6647	2x30l-8_M1S1_mut4-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4226	6648	4x30l-8_M1S1_mut4-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4227	6649	1x30l-8_M1S1_mut5-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4228	6650	2x30l-8_M1S1_mut5-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4229	6651	4x30l-8_M1S1_mut5-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4274	6787	1x30l-8_M1S1_mut6-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4279	/	2x30l-8_M1S1_mut6-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4283	6792	4x30l-8_M1S1_mut6-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4275	6788	1x30l-8_M1S1_mut7-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4280	/	2x30l-8_M1S1_mut7-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4284	6793	4x30l-8_M1S1_mut7-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4276	6789	1x30l-8_M1S1_mut8-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4281	/	2x30l-8_M1S1_mut8-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4285	6794	4x30l-8_M1S1_mut8-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4277	6790	1x30l-8_M1S1_mut9-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4364	/	2x30l-8_M1S1_mut9-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4363	6795	4x30l-8_M1S1_mut9-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4278	6791	1x30l-8_M1S1_mut10-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4282	/	2x30l-8_M1S1_mut10-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16

Materiallisten

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
4286	6796	4x30I-8_M1S1_mut10-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4427	6862	2x30I-8M1S1_mut11-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4430	6866	4x30I-8M1S1_mut11-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
/	6863	2x30I-8M1S1_mut12-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4431	6867	4x30I-8M1S1_mut12-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4428	6864	2x30I-8M1S1_mut13-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4432	6868	4x30I-8M1S1_mut13-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4429	6865	2x30I-8M1S1_mut14-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4433	6869	4x30I-8M1S1_mut14-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4441	6878	4x30I-8M1S1_mut11-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4442	6879	4x30I-8M1S1_mut12-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4443	6880	4x30I-8M1S1_mut13-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4444	6881	4x30I-8M1S1_mut14-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4445	6882	4x30I-8M1S1_mut4-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4446	6883	4x30I-8M1S1_mut10-pBT10GUS	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
3256	4892	30I-8-pHis2.1	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.17
3987	/	30I-8-pHis2.1/pAbAiLIC [Y1H Gold]	in Hefe Y1HGold, Selektion SD-Ura/-Trp	4.11.28, 4.11.30
4230	6652	1x27D-10_M1S2_mut1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4231	6653	2x27D-10_M1S2_mut1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4232	6654	4x27D-10_M1S2_mut1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4233	6655	1x27D-10_M1S2_mut2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4234	6656	2x27D-10_M1S2_mut2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4235	6657	4x27D-10_M1S2_mut2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16

Materiallisten

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
4236	6658	1x27D-10_M1S2_mut3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4237	6659	2x27D-10_M1S2_mut3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4238	6660	4x27D-10_M1S2_mut3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4239	6661	1x27D-10_M1S2_mut4-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4240	6662	2x27D-10_M1S2_mut4-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4241	6663	4x27D-10_M1S2_mut4-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4242	6664	1x27D-10_M1S2_mut5-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4243	6665	2x27D-10_M1S2_mut5-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4244	6666	4x27D-10_M1S2_mut5-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4346	6754	1x27D-10_M1S2_mut6-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4347	6755	2x27D-10_M1S2_mut6-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4348	6756	4x27D-10_M1S2_mut6-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4349	6757	1x27D-10_M1S2_mut7-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4350	6758	2x27D-10_M1S2_mut7-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4351	6759	4x27D-10_M1S2_mut7-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4352	6760	1x27D-10_M1S2_mut8-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4353	6761	2x27D-10_M1S2_mut8-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4354	6762	4x27D-10_M1S2_mut8-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4355	6763	1x27D-10_M1S2_mut9-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4356	6764	2x27D-10_M1S2_mut9-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4357	6765	4x27D-10_M1S2_mut9-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4358	6766	1x27D-10_M1S2_mut10-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4359	6767	2x27D-10_M1S2_mut10-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16

Materiallisten

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
4360	6768	4x27D-10_M1S2_mut10-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4434	6870	2x27D-10_M1S2_mut11-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4437	6874	4x27D-10_M1S2_mut11-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4435	6871	2x27D-10_M1S2_mut12-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4438	6875	4x27D-10_M1S2_mut12-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
/	6872	2x27D-10_M1S2_mut13-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4439	6876	4x27D-10_M1S2_mut13-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4436	6873	2x27D-10_M1S2_mut14-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4440	6877	4x27D-10_M1S2_mut14-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.16
4113	6339	4xGG13_M1S2-pHis2.1	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.17,
4153	/	4xGG13_M1_S2-pHis2.1 [Y1H Gold]	in Hefe Y1HGold. Selektion: SD-Trp	4.11.28, 4.11.30
3912-3914	/	TF-only cDNA-Bank	in XL1 Blue. Titer: >1*10 ⁶ /ml, Carb ^R .	4.11.30
4018	6195	AtWRKY70-pDEST_GAD424	Aus Y1H-Screening mit Bait 30I-8_M1S1-pHis2.1. In XL1 Blue MRF, Carb ^R .	5.4
4110	6314	AtWRKY70-pCR4BLUNT-TOPO	In <i>E. coli</i> TOP10-Zellen. Carb ^R /Kan ^R	4.11.18
4147	6412	WRKY70-pORE-d35S-pA	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.20
4156	6426	WRKY70-pORE-d35S-pA-cmyc	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.20
4320	/	WRKY70-pORE-d35S-pA [C58C1]	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.20
4325	/	WRKY70-pORE-d35S-pA-cmyc [C58C1]	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.20
4313	6727	WRKY70-pQE32	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.19
4329	/	WRKY70-pQE32 M15 [pRep4]	in M15 [pRep4], Kan ^R , Carb ^R	4.11.19

Materiallisten

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Kapitel
4020	6197	SPL7-pDEST_GAD424	aus Y1H-Screening mit Bait 30I-8_M1S1-pHis2.1. In XL1 Blue MRF, Carb ^R .	5.4
4114	6340	SPL7-pCR2.1	in XL1 Blue MRF, Carb ^R . Enthält Mutationen.	4.11.18
4151	6416	SPL7-pORE-d35S-pA	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.20
4157	6427	SPL7-pORE-d35S-pA-cmyc	in XL1 Blue MRF. Kan ^R	4.11.20
4319	/	SPL7-pORE-d35S-pA [C58C1]	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.20
4324	/	SPL7-pORE-d35S-pA-cmyc [C58C1]	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.20
4373	6808	SPL7-DBD-pQE31	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4.11.19
4376	/	SPL7DBD-pQE31 [M15]	in M15 [pREP4], Kan ^R , Carb ^R	4.11.19
4263	6684	JAG-pDEST-GAD424	aus Y1H-Screening mit Bait 27D-10_M1S2-pHis2.1. In XL1 Blue MRF, Carb ^R	5.4
4315	6729	JAG-pCR4Blunt-TOPO	in XL1 Blue MRF, 2 stille Mutationen im ORF., Kan ^R & Carb ^R	4.11.18
4369	6804	JAG-pORE-d35S-pA	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.20
4490	6944	TATA-pGPTV_bar	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.15
4486	6942	4xD-pGPTV_bar	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.15
4478	6938	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.15
3592	5229	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	in XL1 Blue MRF, Kan ^R	4.11.15
4491	/	TATA-pGPTV_bar	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.15
4487	/	4xD-pGPTV_bar	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.15
4479	/	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.15
3631	/	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	in C58C1, Kan ^R , Carb ^R , Rif ^R	4.11.15

Weitere Plasmide aus Koschmann *et al.* (2012):

Glycerinkultur	DNA	Name	Beschreibung	Bezeichnung bei Koschmann et al. (2012)
3921	5900	4x 12i_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	1
3834	5774	4x20u_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	2
3840	5784	4x20u_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	3
3844	5788	4x28M-1_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	4
3827	5767	15AAA_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	5
3923	5902	22A_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	6
3835	5775	22DDD_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	7
3832	5772	21G-2_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	8
3830	5770	38M_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	9
3925	5904	26LLL_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	10
3829	5769	18H_M2S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	11
3924	5903	18H_M2S3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	12
3856	5800	12G_M2S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	13
4118	6620	30I-6_M2S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	14
3833	5773	27G-8_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	15
4384	6810	15CCC_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	16
4126	6628	21Q_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	17
3831	5771	21S_M3S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	18
3922	5901	14S_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	19
4361	6809	30I-8_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	20
3926	5905	30I-8_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	21
3836	5776	30I-8_M1S3-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	22
3828	5768	27D-10_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	23
4130	6632	30H-8_M1S2-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	24
3920	5899	12r_M1S1-pBT10GUS/LUC	in XL1 Blue MRF, Carb ^R	25

10.2. Primer und Oligonukleotide

Primer	Name	Sequenz	Beschreibung	Kapitel
4630	30I-8_M1_S1_fw	ctagtACAACAGACGACTTTTCATAATTCat	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.27 4.11.16
4631	30I-8_M1_S1_rev	ctagaTGAATTATGAAAAGTCGCTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.27 4.11.16
6315	30I-8_M1S1_mut1_f	ctagtGTGGTGAGCGACTTTTCATAATTCat	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6316	30I-8_M1S1_mut1_r	ctagaTGAATTATGAAAAGTCGCTCACCACa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6317	30I-8_M1S1_mut2_f	ctagtACAACAAGTAGTCCTTCATAATTCat	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6318	30I-8_M1S1_mut2_r	ctagaTGAATTATGAAGGACTACTTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16

Materiallisten

6319	30I-8_M1S1_mut3_f	ctagtACAACAGACGACCCCCCTGCGATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6320	30I-8_M1S1_mut3_r	ctagaTGAATCGCAGGGGGTCGTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6321	30I-8_M1S1_mut4_f	ctagtACAACAGACGACTTTTCACGGCCTGt	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6322	30I-8_M1S1_mut4_r	ctagaCAGGCCGTGAAAAGTCGTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6323	30I-8_M1S1_mut5_f	ctagtACAACAGACAGTCCCCCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6324	30I-8_M1S1_mut5_r	ctagaTGAATTATGGGGGACTGTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6777	30I-8M1S1_m6_f	ctagtGTGGCAGACGACTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6778	30I-8M1S1_m6_r	ctagaTGAATTATGAAAAGTCGTCTGCCACa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6779	30I-8M1S1_m7_f	ctagtACAGTGAACGACTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6780	30I-8M1S1_m7_r	ctagaTGAATTATGAAAAGTCGTTCACTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6781	30I-8M1S1_m8_f	ctagtACAACAAGTAACTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6782	30I-8M1S1_m8_r	ctagaTGAATTATGAAAAGTTACTTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6783	30I-8M1S1_m9_f	ctagtACAACAGACAGTCTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6784	30I-8M1S1_m9_r	ctagaTGAATTATGAAAGACTGTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6785	30I-8M1S1_m10_f	ctagtACAACAGACGACCCCCCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6786	30I-8M1S1_m10_r	ctagaTGAATTATGGGGGGTCGTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6911	30I-8M1S1_m11f	ctagtACAACAAGCGACTTTTCATAATTCA tctaACAACAAGCGACTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6912	30I-8M1S1_m11r	ctagaTGAATTATGAAAAGTCGCTTGTTGT tactagaTGAATTATGAAAAGTCGCTTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6913	30I-8M1S1_m12f	ctagtACAACAGATAACTTTTCATAATTCA tctaACAACAGATAACTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6914	30I-8M1S1_m12r	ctagaTGAATTATGAAAAGTTATCTGTTGT tactagaTGAATTATGAAAAGTTATCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6915	30I-8M1S1_m13f	ctagtACAACAGACGGTTTTTCATAATTCA tctaACAACAGACGGTTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6916	30I-8M1S1_m13r	ctagaTGAATTATGAAAAACCGTCTGTTGT tactagaTGAATTATGAAAAACCGTCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6917	30I-8M1S1_m14f	ctagtACAACAGATGACTTTTCATAATTCA tctaACAACAGATGACTTTTCATAATTCA	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6918	30I-8M1S1_m14r	ctagaTGAATTATGAAAAGTCATCTGTTGT tactagaTGAATTATGAAAAGTCATCTGTTGTa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16

Materiallisten

5115	27D-10_M1S2 fwd	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	5.11
5116	27D-10_M1S2 rev	ctagaCTCAAAGAATACTTTTCAAAGTGAACA a	5`-Phosphat, 100 µM	5.11
6325	27D-10_M1S2_mut1_f	ctagtGTCCTGTTTTGAAAAGTATTCTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6326	27D-10_M1S2_mut1_r	ctagaCTCAAAGAATACTTTTCAAACAGGAC a	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6327	27D-10_M1S2_mut2_f	ctagtTGTTCTCCAGGGAGTATTCTTTGAG t	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6328	27D-10_M1S2_mut2_r	ctagaCTCAAAGAATACTCCCTGGGACGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6329	27D-10_M1S2_mut3_f	ctagtTGTTCACTTTGAGGGACGCCTTTTGAG t	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6330	27D-10_M1S2_mut3_r	ctagaCTCAAAGGCGTCCCTCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6331	27D-10_M1S2_mut4_f	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATCTCCAGTt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6332	27D-10_M1S2_mut4_r	ctagaACTGGGAGATACTTTTCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6333	27D-10_M1S2_mut5_f	ctagtTGTTCACTTTGGGGGACGTTCTTTGAG t	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6334	27D-10_M1S2_mut5_r	ctagaCTCAAAGAACGTCCCCCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6744	27D-10_M1S2m6_f	ctagtTGTTCTCCTGAAAAGTATTCTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6745	27D-10_M1S2m6_r	ctagaCTCAAAGAATACTTTTCAGGACGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6746	27D-10_M1S2m7_f	ctagtTGTTCACTCCAGAAAGTATTCTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6747	27D-10_M1S2m7_r	ctagaCTCAAAGAATACTTTCTGGAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6748	27D-10_M1S2m8_f	ctagtTGTTCACTTTGGGGGGTATTCTTTGAG t	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6749	27D-10_M1S2m8_r	ctagaCTCAAAGAATACCCCCCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6750	27D-10_M1S2m9_f	ctagtTGTTCACTTTGAAAGACGTTCTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6751	27D-10_M1S2m9_r	ctagaCTCAAAGAACGTCTTTCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6752	27D-10_M1S2m10_f	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTGCCTTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6753	27D-10_M1S2m10_r	ctagaCTCAAAGGCACTTTTCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6919	27D-10_M1S2_m11f	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTGAGt ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTGAGt	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6920	27D-10_M1S2_m11r	ctagaCTCAAGAAATACTTTTCAAAGTGAACA actagaCTCAAGAAATACTTTTCAAAGTGAAC Aa	5`-Phosphat, 100 µM	4.11.16

Materiallisten

6921	27D-10_M1S2_m12f	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTCCGAGt ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTCCGAGt	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6922	27D-10_M1S2_m12r	ctagaCTCGGAGAATACTTTTCAAAGTGAAC AactagaCTCGGAGAATACTTTTCAAAGTGAA CAa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6923	27D-10_M1S2_m13f	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTAGGt ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTAGGt	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6924	27D-10_M1S2_m13r	ctagaCCTAAAGAATACTTTTCAAAGTGAACA actagaCCTAAAGAATACTTTTCAAAGTGAAC Aa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6925	27D-10_M1S2_m14f	ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTGACt ctagtTGTTCACTTTGAAAAGTATTCTTTGACt	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6926	27D-10_M1S2_m14r	ctagaGTCAAAGAATACTTTTCAAAGTGAACA actagaGTCAAAGAATACTTTTCAAAGTGAAC Aa	5'-Phosphat, 100 µM	4.11.16
6927	MS23_left_HindIII_new	tagcAAGCTTgaattcgcgccgactagct	Zur Amplifikation von cis- Elementen aus pBT10-GUS	4.11.15
6928	MS23_right_SmaI_short	atCCCGGGggtggccactcgagc		
6417	Bait_l	ttcattaatgcagcggatca	Primer zur Amplifikation von cis- Elementen aus pBT10GUS und Subklonie- rung in pHIS2.1	4.11.17
6418	Bait_r	gcGAGCTCggtcttgcggtcgactcta		
6335	c-myc fwd	TCGAGCCTCGACCTCAACACAACATGGCA GAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTG T	Oligonukleotide zur Erstellung eines c-myc Tags in einem Vektor mittels <i>XhoI</i> und <i>XbaI</i> Überhängen die beim Annealen entstehen. Das Tag enthält ein ATG gefolgt von den Codons für AEQKLISEEDL (c-myc Tag)	4.11.20
6336	c-myc rev	CTAGACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTT GTTCTGCCATGTTGTGTTGAGGTCGAGGC		
6148	GAL4AD-RV	CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC	Primer zur Amplifikation des cDNA-Inserts positiver Klone aus der TF-only Library	4.11.30
6149	GAL4AD	CTATTCGATGATGAAGATACCCC		
6231	AtWRKY70 -02 f	GGATCCAAATGGATACTAATAAAGC	Primer zur Amplifikation von AtWRKY70 aus cDNA. und Klonierung mittels der <i>Bam</i> - HI/ <i>KpnI</i> Linker	4.11.18
6232	AtWRKY70 1061r	GGTACCCACTCATTAGAGAAAAGGGCAAA		
6931	SPL7 fwd2	GACCCCGGGTATGTCTTCTCTGTGCAATC GCCACCAC	Primer zur Amplifikation von SPL7 aus cDNA und Klonie- rung mittels der <i>SalI</i> / <i>SmaI</i> Linker. 60 °C Annealing	4.11.18
6932	SPL7 rev2	GTCGACTCAAATTTGTGTACCAATCTCATT CGGATTGC		
6802	SPL7 DBD f	TCGGATCCTGAGCTTGATCAGAAATTGGAA	Primer zur Klonierung der SPL7-DNA-Bindungsdomäne mittels <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Schnittstellen	4.11.19
6803	SPL7 DBD r	TTAAGCTTTGACGCTGTTATCATTCTGTGA		
6929	JAG cDNA fwd234	TAGGATCCTCATGAGGCATGAGGAGAATTA CTTAGAC	Primer zur Klonierung von JAG direkt aus der TF-only Bank	4.11.18
6930	JAG cDNA rev963	TAGCGTCGACTCAGAGCGAGTGATGATCT TGAAACCGATTGAT		
4632	30I-8 M1S2 fwd	ctagaCTATATGACAAAAGTCAAACATAAAat	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
4633	30I-8 M1S2 rev	ctagtTTTATGTTTGACTTTTGTGATATAGt	5'-Phosphat, 100 µM	5.11

Materiallisten

5182	30I-8 M1S3 fwd	ctagaTCGTTCTTCAGTCAAAAAGTCAAACCTCTCTCTc	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
5183	30I-8 M1S3 rev	ctagtGAGAGAGATAGTTTGACTTTTTGACTGAAGAACGAa	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
5113	21S_M3_S1_fwd	ctagaTAATTTCTCTTGCGTAGAAAAGTCTGATCGGGAAGt	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
5114	21S_M2_S1_rev	ctagtCTTCCCGATCAGACTTTTCTACGCAAGAGAAATTa	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
5897	30-H8_M1S2_fwd	ctagaTGGTCAGCATGTTGGACTTTCCAAATTCATTGACct	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
5898	30-H8_M1S2_rev	ctagtGGTCAATGAATTTGGAAAGTCCAACATGCTGACCAa	5'-Phosphat, 100 µM	5.11
6933	30I-8_M1_S1_fw [Bio]	ctagtACAACAGACGACTTTTCATAATTCat-BIO	3'-Biotin, für Gelshift-Experimente, 0,1 µM	4.11.26
6934	30I-8_M1_S1_rev [Bio]	ctagaTGAATTATGAAAAGTCGTCTGTTGTa-BIO	3'-Biotin, für Gelshift-Experimente , 0,1 µM	4.11.26

10.3. Pflanzensamen

Nummer	Name	Linie	Generation	Anmerkung	Kapitel
8143	pORE-d35S-pA	/	FloralDip	in Col-O	4.11.20
8207-B	35S-pGPTV_bar	1	T1	in Col-O	4.8, 5.2, 5.3
8208	35S-pGPTV_bar	2	T1	in Col-O	4.8, 5.2, 5.3
8209	35S-pGPTV_bar	3	T1	in Col-O	4.8, 5.2, 5.3
8210	35S-pGPTV_bar	4	T1	in Col-O	4.8, 5.2, 5.3
8211	35S-pGPTV_bar	5	T1	in Col-O	4.8, 5.2, 5.3
8212	35S-pGPTV_bar	5	T2	in Col-O	
8213	35S-pGPTV_bar	5	T2	in Col-O	
8214	TATA-pGPTV_bar	2	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8215	TATA-pGPTV_bar	3	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8216	TATA-pGPTV_bar	4	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8217	TATA-pGPTV_bar	5	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8218	TATA-pGPTV_bar	5	T2	in Col-O	
8219	TATA-pGPTV_bar	5	T2	in Col-O	
8220	4xD-pGPTV_bar	1	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8221	4xD-pGPTV_bar	2	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8222	4xD-pGPTV_bar	3	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8223	4xD-pGPTV_bar	4	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8224	4xD-pGPTV_bar	1	T2	in Col-O	
8225	4xD-pGPTV_bar	1	T2	in Col-O	
8226	4xD-pGPTV_bar	1	T2	in Col-O	
8227	4xD-pGPTV_bar	1	T2	in Col-O	
8228	4xD-pGPTV_bar	2	T2	in Col-O	
8229	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8230	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8231	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	

Materiallisten

8232	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8233	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8234	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8235	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8236	4xD-pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8237	4xD-pGPTV_bar	4	T2	in Col-O	
8238	4xD-pGPTV_bar	4	T2	in Col-O	
8239	4xD-pGPTV_bar	4	T2	in Col-O	
8240	4xD-pGPTV_bar	4	T2	in Col-O	
8241	4xD-pGPTV_bar	4	T2	in Col-O	
8242	4xD-pGPTV_bar	4	T2	in Col-O	
8243	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	1	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8244	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	2	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8245	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	3	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8246	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	4	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8247	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	5	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8248	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	6	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8249	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	7	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8250	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	8	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8251	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	9	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8252	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	10	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8253	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	11	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8254	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	12	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8255	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	13	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8256	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	14	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8257	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	2	T2	in Col-O	
8258	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	2	T2	in Col-O	
8259	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8260	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8261	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8262	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	6	T2	in Col-O	
8263	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	6	T2	in Col-O	
8264	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	6	T2	in Col-O	
8265	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	6	T2	in Col-O	
8266	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	6	T2	in Col-O	
8267	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	8	T2	in Col-O	
8268	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	8	T2	in Col-O	
8269	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	8	T2	in Col-O	
8270	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	8	T2	in Col-O	
8271	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	13	T2	in Col-O	
8272	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	13	T2	in Col-O	
8273	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	13	T2	in Col-O	
8274	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	14	T2	in Col-O	
8275	30I-8_M1S1_pGPTV_bar	14	T2	in Col-O	
8276	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	1	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8277	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	2	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3

Materiallisten

8278	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	3	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8279	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	4	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8280	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	5	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8281	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	7	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8282	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	8	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8283	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	9	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8284	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	10	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8285	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	11	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8286	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	12	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8287	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	13	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8288	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	14	T1	in Col-O	4.11.15, 5.2, 5.3
8289	Col-0	/	/	-	4.4
8290	WRKY70-pORE-d35S-pA	1	T1	in Col-O	4.11.20
8291	SALK_025198C (wrky70-KO)	/	/	<i>wrky70</i>	6
8292	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	2	T2	in Col-O	
8293	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	2	T2	in Col-O	
8294	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8295	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	3	T2	in Col-O	
8296	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	5	T2	in Col-O	
8297	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	5	T2	in Col-O	
8298	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	8	T2	in Col-O	
8299	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	8	T2	in Col-O	
8300	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	10	T2	in Col-O	
8301	27D-10_M1S2_pGPTV_bar	10	T2	in Col-O	
8302	pORE-d35S-pA-cymc	/	FloralDip	in Col-O	4.11.20
8304	pORE-d35S-pA-cymc	/	FloralDip	in Col-O	4.11.20
8305	WRKY70-pORE-d35S-pA-cymc	/	FloralDip	in Col-O	4.11.20
8306	WRKY70-pORE-d35S-pA-cymc	/	FloralDip	in Col-O	4.11.20
8307	WRKY70-pORE-d35S-pA-cymc	/	FloralDip	in Col-O	4.11.20

11. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Reinhard Hehl, der mir die Arbeit an diesem interessanten Projekt ermöglicht hat. Er hat mich als Mentor hervorragend betreut und gefördert und hatte immer ein offenes Ohr für Fragen. Seine vielen konstruktiven Vorschläge und Ideen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Ludger Beerhues möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Bei der KWS Saat AG bedanke ich mich für die Teilfinanzierung meiner Arbeit und bei Dr. Dietmar Stahl und Dr. Friedtjof Weltmeier für die interessanten Ideen und Anregungen während unserer Projekttreffen.

Marlies Becker möchte ich ganz besonders für die viele Hilfe bei den Protoplasten-Transfektionen danken, die ich ohne sie nicht so schnell hätte bewältigen können.

Felix Umrath und Lilith Christaller danke ich für die experimentellen Ergebnisse, die sie während der Bachelorarbeit bzw. einem Laborpraktikum beigesteuert haben. Bei Jonas, Eva und Cathi bedanke ich mich für eine besonders spaßige Zeit während ihrer Masterarbeiten.

Allen aktuellen und früheren Mitgliedern der AG Hehl und allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik möchte ich für die immer freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken. Neben den wissenschaftlichen Diskussionen habe ich auch die gemeinsamen Pausen sehr genossen. Besonders möchte ich hier meine Laborpartner Julia, Marlies und seit neustem Mona nennen. Nicht zu vergessen sind auch Ralph, Jeannette, Lorenz und Elke. Es hat immer Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten.

Ein gesonderter Dank geht auch an meine Korrekturleser Julia, Marlies, Natascha, Vicky und Jonas. Sorry für die vielen Kommata die ich vergessen habe.

Meiner ganzen Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben. Besonders meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht haben und immer für mich da waren.

Meiner Frau Natascha möchte ich dafür danken, dass sie mich immer aufgebaut hat wenn mal etwas schief ging, mich immer unterstützt hat und mir wenn es nötig war den Rücken freigehalten hat. Ohne Dich wäre ich wahrscheinlich das ein oder andere Mal der Verzweiflung nah gewesen. Ich freue mich drauf demnächst wieder mehr Zeit für Dich zu haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Fabian Machens
Geburtsdatum: 31. März 1984
Geburtsort: Hildesheim
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

1990-1994: Grundschule St. Bernward, Hildesheim
1994-2003: Gymnasium Josephinum, Hildesheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2003-2008: Diplomstudiengang Biotechnologie
Technische Universität Braunschweig

Diplomarbeit am Institut für Genetik
„Funktionelle Analyse potentiell pathogenresponsiver
cis-Elemente aus *Arabidopsis thaliana*“ (2008)

Abschluss: Diplom-Biotechnologe

Beschäftigung

seit 2008: Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Institut für Genetik (AG Prof. Dr. Hehl)
Technische Universität Braunschweig

Publikationen

Lisson, R., Hellert, J., Ringleb, M., Machens, F., Kraus, J., Hehl, R. (2010). Alternative splicing of the maize *Ac* transposase transcript in transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* **74** (1-2): 19–32.

Niemeyer, J., Machens, F., Fornefeld, E., Keller-Hüschemenger, J., Hehl, R. (2011). Factors required for the high CO₂ specificity of the anaerobically induced maize *GapC4* promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell Environ.* **34** (2): 220–229.

Koschmann, J., Machens, F., Becker, M., Niemeyer, J., Schulze, J., Bülow, L., Stahl, D.J., Hehl, R. (2012). Integration of bioinformatics and synthetic promoters leads to the discovery of novel elicitor-responsive *cis*-regulatory sequences in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **160** (1): 178–191.

Niemeyer, J., Ruhe, J., Machens, F., Hehl, R. (2013) Differential expression of the TMV resistance gene *N* prevents a hypersensitive response in seeds and during germination. *Planta* **237** (3): 909-915

Tagungsbeiträge

Vorträge

Machens, F., Pohl, S, Koschmann, J., Bülow, L., Stahl, D.J., Hehl, R. PathoPlant®-assisted prediction of two kinases simultaneously involved in the *Arabidopsis* response to fungal and bacterial pathogens. 9th Conference of the European Foundation for Plant Pathology & the 6th Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia (15-18 November 2010, Evora, Portugal)

Poster Beiträge

Lisson, R., Hellert, J., Ringleb, M., **Machens, F.,** Kraus, J., Hehl, R. Alternative splicing of the maize *Ac* transposase transcript in transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) reveals novel introns. 23. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen (23-26 Februar 2010, Wermelskirchen-Dabringhausen, Deutschland)

Machens, F., Pohl, S, Koschmann, J., Bülow, L., Hehl, R. Database assisted identification of a pathogen upregulated cell wall associated kinase (*WAK3*). Communication in Plants and their Responses to the Environment (19-22 Mai 2011, Halle (Saale), Deutschland)